



TITLE:

エステラーゼアイソザイムによる
ミカンハダニPanonychus
citri(McGregor)の種内変異の解析(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

刑部, 正博

CITATION:

刑部, 正博. エステラーゼアイソザイムによるミカンハダニPanonychus
citri(McGregor)の種内変異の解析. 京都大学, 1992, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1992-01-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3086494>

RIGHT:

エステラーゼアイソザイムによるミカンハダニ
Panonychus citri (McGregor) の種内変異の解析

1991

刑 部 正 博

エステラーゼアイソザイムによるミカンハダニ
Panonychus citri (McGregor)の種内変異の解析

1991

刑部正博

目 次

第1章 緒 言	1
第2章 供試材料	6
第3章 ミカンハダニとエステラーゼアイソザイム	8
1. 種内にみられるエステラーゼアイソザイムの変異	8
2. 非特異的エステラーゼの性質	14
第4章 ミカンハダニの生態的特性の変異とエステラーゼアイソザイム ..	22
1. 寄生性の変異とエステラーゼアイソザイム	22
a. 各地の個体群の寄生型とエステラーゼ型	22
b. ナシ寄生型個体群におけるエステラーゼ活性の変異	25
c. まとめ	26
2. 休眠性の変異とエステラーゼアイソザイム	27
a. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるエステラーゼアイソ ザイムの分離	27
b. 各地の個体群の休眠性とエステラーゼ型	29
c. まとめ	33
第5章 エステラーゼ型が異なるミカンハダニ個体群間にみられる形態 的変異	35
1. 走査型電子顕微鏡による微細構造の比較	35
2. プレパレート標本による形態比較	41
3. 地域個体群のエステラーゼ型と形態的変異	52
4. まとめ	57
第6章 変異集団の分化の要因	58
1. 個体群間の遺伝的分化	58
a. CT型個体群におけるエステラーゼアイソザイム遺伝子頻度の地 理的変異	58
1). α -Est1 遺伝子分析	58
2). α -Est1 対立遺伝子頻度の個体群間差異	63

3). まとめ	65
b. PR型個体群における寄生性の変異と生殖的隔離	67
1). PR型内における寄生性の分化	67
2). PR型個体群間の生殖的隔離	69
3). まとめ	73
2. 寄生性の変異の要因	74
a. 数種の植物におけるCT型およびPR型個体群の発育	74
b. PR型個体群のトロビタオレンジとカラタチの体細胞雑種におけ る発育	76
c. 寄主植物の種類がCT型個体群のエステラーゼ活性に及ぼす影響 ..	77
d. まとめ	83
第7章 総合考察	84
要 約	90
引用文献	93

第1章 緒 言

ハダニ類は蛛形綱ダニ目のハダニ上科に属し（江原，1975a），ほとんどが体長1 mmにも満たない微細な生物である。これらハダニ類は植物に寄生し，口針で葉の表皮細胞を刺し通し，葉肉細胞から内容物を吸収する（田中・井上，1964；建石，1987）。一般に多食性で，通常高い増殖力を有するため多くの農業害虫を含んでいる。また，有機りん剤を始めとする各種の農業薬剤に対するハダニ類の抵抗性の発達が世界各国から報告され，重要な問題になっている（Brader，1977；Helle，1984；井上，1989）。わが国においてもミカンハダニ *Panonychus citri* (McGregor)（八田，1973；木村・貞井，1973；森・武智，1973；関・松尾，1973；西野・大串，1973；井上，1986，1989；Osakabe and Inoue，1988）やカンザワハダニ *Tetranychus kanzawai* Kishida（刑部，1973a，b；桑原，1984a，b；Kuwahara，1984；浜村，1984，1985）などが，開発された防除薬剤に対して次々に著しい抵抗性を獲得し，カンキツやチャなどで重要な難防除害虫になっている。

本研究で取り上げたミカンハダニは同胞種のリンゴハダニ *P. ulmi* (Koch) と共にハダニ上科の *Panonychus* 属に含まれる。わが国ではこれらにごく最近記載されたニホンササハダニ *P. bambusicola* Ehara and Gotoh（Ehara and Gotoh，1991）を加えた3種で1属を形成している。ミカンハダニの染色体数は $n = 3$ で，他の多くのハダニ類と同様に雌は2倍体，雄は半数体で，交尾した雌成虫は受精卵と未受精卵を，また未交尾雌は未受精卵だけを産み，受精卵は雌に，未受精卵は雄になる（江原，1975a，b；Helle and Pijnacker，1985）。ミカンハダニはカンキツ類を始めナシ，モモなどの落葉性果樹に寄生し，その他クワやモクセイ，マメツゲなどにも発生する（江原，1975c）広食性のハダニで，Ashihara（1987）によればマメ科植物でも発育する。本種の生態については特にカンキツ類で詳しく研究されている（真梶，1959a，b，1962；森，1964；田中・井上，1970；加藤，1972；Nakao et al.，1977；古橋・西野，1979a，b；古橋，1980；村岡，1983；Wanibuchi and Saito，1983）。発育速度が速く，25℃では産卵されてからほぼ2週間程度で成虫になり（真梶，1959a；内田，1982），西南暖地のカンキツでは年間に13～14世代を経過する（真梶，1959b）。これらに加えて，本種の農業上の重要性から，被害解析（関・小林，1963；内田ら，1966；松尾・関，1969a，b，1976；大久保，1983；浜村ら，1984）やシミュレーションモデルによる発生予察（塩見ら，1983；松本ら，1983）なども試みられている。また，かつて矢後・古郡（1937a，b）によりナシに寄生していることが報告されたナシハダニと横山・石井（1934）によりクワの害虫として報告されたクワオオハダニ（原文ではクワオホハダニ）が，その後Ehara（1955，1956）によりミカンハダニと同種であること

が確認されたことにより、種々の植物における研究が開始された。このような背景からナシやモモなどに寄生するミカンハダニの研究が進み、またカンキツ寄生のミカンハダニはカンキツよりもむしろナシやモモに寄生した場合の方が産卵数が多く、増殖能力が高いことなどが明らかにされてきた（古橋・西野，1979b；内田，1982）。これらの研究の中で、真梶（1961b）がナシの個体群では冬季に卵休眠するものがあることを明らかにした。このため、本種における休眠性の変異が注目されるようになった。

現在、ミカンハダニの休眠性が異なる個体群は便宜的に非休眠系統と休眠系統（真梶，1961a，1961b）として類別されている。すなわち、非休眠系統は年間を通じてまったく休眠しないのに対して、休眠系統は9月から10月の短日条件下でナシなどの落葉性果樹の枝に休眠卵を産みつけ、卵のまま越冬する（内田・真梶，1980；内田，1982；孫ら，1988）。真梶・内田（1980），内田（1982）および Fujimoto and Takafuji（1988）の調査により、この休眠系統の休眠卵産卵の臨界日長は20℃でほぼ13時間前後であることが明らかにされている。さらにFujimoto and Takafuji（1986）は光周期感受性を親世代の発育ステージ別に検討し、全発育ステージに感受性があるが、特に第1若虫期と第2若虫期に連続して短日条件下に曝されると休眠率が著しく上昇することを示した。また、彼らは長日の休眠阻止効果も短日の休眠誘起効果も累積されるが、長日効果の方が短日効果よりも強いことも指摘している。

真梶（1961a）は両系統の地理的分布を調査し、休眠系統はナシでは10月の地面温度が18℃より低い地方に分布していることを指摘した。しかしその後、それより南で休眠系統の発生が知られていなかった九州地方のナシ園でも休眠系統が発生した（山田・野田，1985）。また、千葉県や岡山県では年度や地域によって発生するミカンハダニの系統が異なり（真梶ら，1986；森本・高藤，1983），両系統が混発しているナシ園があることが報告されるなど（Takafuji and Morimoto，1983；孫ら，1988），これら両系統の分布は変化し、なおかつ複雑化している。ナシ園にミカンハダニが発生する場合、通常、非休眠系統の卵は樹上で越冬できないため（Takafuji and Fujimoto，1986），この系統だけが分布している地域では森本・高藤（1983）が指摘しているようにカンキツで発生した個体の流入などにより、通常秋に発生のピークがみられる。これに対して、両系統が混発するナシ園では、樹上で越冬した休眠系統の卵が春先にふ化し、発育と増殖を始めるため、春から発生がみられ夏にピークを示し、その後非休眠系統が発生する。このため、混発園では発生のピークが2回みられる（Takafuji and Morimoto，1983；孫ら，1988）。したがって、それまで分布が確認されていない地域に新たに休眠系統が侵入すると、春先の発生の確認が遅れ、思わぬ被害を受ける場合がある。

ミカンハダニの種内では休眠性だけでなく、寄生性にも個体群間変異がみられる。休眠性と寄生性との関係について、真梶（1961b）、内田（1982）および森本・高藤（1983）はナシから採集した休眠系統がいずれもカンキツでは発育できないことを示した。このため、ミカンハダニの寄生性は休眠性とともに変異していると考えられている。寄生性も休眠性と同様に野外における個体群の動態に影響を及ぼす重要な生態的特性であり、これらの変異の遺伝的關係は果樹園におけるミカンハダニの防除の上でも重要な問題である。したがって、ミカンハダニの変異個体群の識別法を確立し、その特性を把握することが農業上重要である。

これらの生態的特性の変異の遺伝的關係を解明するためには、まず個体群を休眠性や寄生性の相違によって分類し、それぞれの特性を詳細に調査する必要がある。このためには個体レベルでそれらの生態的特性を判定することができる指標が必要であり、その指標として、両系統の雌雄に顕著な形態的差異が見い出されることが望まれる。しかし、両系統の形態については、これまで体色の若干の相違（真梶，1961a）と卵径の違い（内田，1982）が示されているだけで、両者を識別するための明瞭な差異は知られていない。また、飼育実験によって休眠性や寄生性の変異を識別するためには多くの時間と労力を要し、しかも個体ごとにその変異を判定することはきわめて難しい。したがって、休眠性と寄生性の遺伝的關係や両系統の特性に関する詳細な調査は困難であった。

1960年代以降のゲル電気泳動法の発展により、酵素タンパクなどの分子レベルで生物の遺伝的変異を検出できるようになった。また、電気泳動法に基づいた遺伝的距離の算出法や系統関係の解析法が種々考案された（Nei, 1987）。これによって、形態に基づく分類学や発生学とは異なった角度からも生物の変異や進化が論ぜられるようになった。現在では既にショウジョウバエ科のDrosophila属（Ohnishi et al., 1983; Watada et al., 1986）やカ科のAnopheles属の一種（Takai, 1986）、ミツバチ科のBombus属とPsithyrus属（Pekkarinen, 1979; Pamilo et al., 1981, 1984, 1987）、アリ科のRhytidoponera属（Ward, 1980）などの昆虫類や脊椎動物、魚類および植物に至る様々な生物において、タンパクの分子進化に基づいた遺伝的距離の測定と系統関係の解明が行われている。

ハダニ類においても、Ogita and Kasai (1965) がミカンハダニとナミハダニ T. urticae Kochのエステラーゼ、酸性フォスフォモノエステラーゼおよびアミラーゼを寒天ゲル電気泳動法により検出した。その後、ミカンハダニ（武久・田中，1967；田中ら，1972）やカンザワハダニ（Kawahara et al., 1981；桑原，1982，1984b）、ナミハダニ（Blank, 1979；Weyda et al., 1984）などでエステラーゼアイソザイムが検出され、主に有機りん剤抵抗性との関係について検討された。一方、Sula and Weyda (1983) はナミハダニの個体群間および個体群内にエステ

ラーゼアイソザイムの顕著な多型現象があることを示し、Ward et al. (1982) はナミハダニ、*T. turkestan* (Ugar. and Nik.) および *T. pacificus* からリンゴ酸脱水素酵素の遺伝子頻度を調査した。また、最近になって Gotoh et al. (1991) はオウトウハダニ *T. viennensis* Zacher のエステラーゼアイソザイムを検出し、休眠性の異なる個体群間にエステラーゼ活性の相違があることを示した。このように、電気泳動法の有用性はハダニ類の研究においても認められてきた。これらの研究の中で、武久・田中 (1967) はミカンハダニの遺伝的変異についてエステラーゼアイソザイムの地域個体群間差異を指摘している。しかし、この報告で扱われているミカンハダニはいずれもカンキツに寄生しているものであり、休眠系統の発生が報告されているナシやモモの個体群に関する調査は行われていない。

アイソザイム分析により、ミカンハダニの休眠性や寄生性が個体ごとに識別できれば、それらの特性を様々な角度から詳細に検討することが可能になる。そこで、本研究では先ずミカンハダニの非休眠系統と休眠系統の識別法を確立する目的で、両系統の遺伝的差異を電気泳動法により検討した。ここでは、始めに武久・田中 (1967) が地域個体群間差異を検出したエステラーゼアイソザイムに着目し、ミカンハダニ種内における変異とその理化学的性質について検討した (第3章)。続いて第4章では各地から採集した個体群について寄生性および休眠性と共にエステラーゼアイソザイムを調査し、これらの関係を解明した。また、それと同時に遺伝的差異に基づいた両系統の識別法を確立した。さらに第5章では第4章の結果に基づいて分類された個体群の形態を走査型電子顕微鏡ならびに生物顕微鏡を用いて精査し、両系統の形態的差異を明らかにした。

ハダニ類はその生態的および遺伝的特性から集団の細分化と集団間における遺伝的分化が生じ易いと考えられる (刑部, 1991)。事実、de Boer (1981, 1985) はナミハダニの地域個体群間に "infertility barrier" があることを示しており、また農業上問題となっているハダニ類の薬剤抵抗性の発達は集団の遺伝的分化と優れた適応能力を示すものとも考えられる。ミカンハダニに関して報告されている休眠性や寄生性などの生態的変異はきわめて顕著であり、さらに休眠系統について報告されている生態的特性は同種の非休眠系統よりむしろ近縁種のリンゴハダニとの間に多くの共通点もみられる。本研究は1981～1990年にかけて果樹試験場安芸津支場 (広島県豊田郡安芸津町三津) において行ったものであるが、この間にミカンハダニの休眠性の変異に関わる問題は複数の研究者によって取り上げられ、休眠性の異なる個体群間における生殖的隔離の存在 (Takafuji and Fujimoto, 1986; Takafuji, 1986, 1988) が指摘され、最近では雄成虫の挿入器の形態的差異が指摘されている (国本ら, 1991)。したがって、ミカンハダニはハダニ類における生態的特性の変異とそれに伴う集団の分化機構を解明する上できわ

めて好適な材料といえよう。

そこで、ミカンハダニにおける集団の分化機構を解明する目的で、同じ生態的特性を有する個体群間の遺伝的変異を調査し、また系統間の寄生性の分化の要因について検討した（第6章）。ここでは、個体群間の遺伝的分化について調査するため、エステラーゼアイソザイムの遺伝子分析を行い、地域個体群の対立遺伝子頻度を調査した。これによって、地域間および寄主植物間の遺伝的分化を明らかにし、遺伝子型頻度の検討からミカンハダニの繁殖様式について重要な示唆を得た。寄生性と生殖に関する調査では、当初、同じ生態的特性を有すると考えられた地域個体群間でさらに分化が進んでいることを明らかにした。また、各種の植物における発育とそれぞれの植物において発育したミカンハダニのエステラーゼ活性を調査し、寄生性の分化とエステラーゼ活性との関係を解明した。

最後に本研究の結論として、エステラーゼアイソザイムを遺伝的指標として得られたミカンハダニの休眠性と寄生性との関係、およびこれら生態的特性の異なる個体群間の雌雄の形態的差異とともに前述の生殖的隔離（Takafuji and Fujimoto, 1986; Takafuji, 1986, 1988）および雄成虫の形態的差異（国本ら, 1991）に関する知見を総括して分類学上の基準（平嶋ら, 1989）に照らし、おもに生物学的観点からこれらの分類学的位置づけに関する提案を行い、またミカンハダニにおける変異個体群の分化の要因について提示した。

研究の実施にあたり、前果樹試験場虫害研究室長の井上晃一博士、当安芸津支場虫害研究室の坂神泰輔室長ならびに口之津支場虫害研究室の芦原 亘室長より、終始ご指導とご鞭撻をいただいた。本論文の取りまとめに当たっては、京都大学農学部 of 久野英二教授ならびに高藤晃雄助教授から本稿のご校閲と懇切なご指導ならびにご批判をいただくことができた。ここに深く感謝の意を表する。また、北海道大学農学部の斎藤 裕博士には常日頃よりあたたかいご指導とご支援をいただき、名古屋大学農学部の宮田 正博士、熱帯農業研究センターの桑原雅彦博士、東北農業試験場害虫発生予察研究室の宮井俊一室長、果樹試験場安芸津支場育種法研究室の小林省藏博士、愛媛大学教養部生物学教室の和多田正義博士の各位よりご指導をいただいた。また、果樹試験場企画連絡室長の伊庭慶昭博士ならびに当安芸津支場長の上野 勇博士にはあたたかいご激励とご支援をいただいた。ハダニの採集にあたっては各地の大学ならびに試験場の各位より多大なご協力をいただき、その飼育ならびに供試植物の栽培には当支場の山下礼子氏にご助力いただいた。ここに記して厚くお礼申し上げます。

第2章 供試材料

本研究で用いたミカンハダニは果樹試験場安芸津支場のガラス室内で累代飼育されている4個体群（KgHt, EhMy1, FoYkおよびSg0g）と日本各地のカンキツおよびナシを中心に採集された個体群である（第1表）。なお、野外から採集された個体群は必要に応じて恒温槽（20℃）あるいは実験室（25℃）で、寒天ゲル（0.5%；少量のクリスタルバイオレットを含む）上に置いたカンキツ、ナシ、モモ、クワなどの葉片を用いて飼育した。

第1表-1 供試虫の来歴

個体群	採集場所	採集年	寄主植物
<ミカンハダニ>			
HkSp	北海道札幌市	1987, 1990	ヤマグワ
FsFs	福島県福島市飯坂町	1984	カラタチ
IsKg	石川県加賀市奥谷地区	1983	ナ シ
NnTk	長野県下伊那郡高森町	1986	ナ シ
IkTb	茨城県つくば市谷田部町	1986	ナ シ
IkTy	茨城県新治郡千代田村	1983	ナ シ
IkAm	茨城県稲敷郡阿見町	1983	ナ シ
TbMd	千葉県松戸市松戸	1986	ツ ゲ
TbYc	千葉県八千代市上高野	1986	ナ シ
TbTy	千葉県館山市山本	1990	カンキツ
KgHt	神奈川県平塚市	1971	カンキツ
KgNb	神奈川県小田原市	1989	カンキツ
YnYn	山梨県山梨市万力	1986	モ モ
YnMs	山梨県東八代郡御坂町	1986	ナ シ
YnIw	山梨県東八代郡石和町	1989	ナ シ
SoKg	静岡県掛川市	1990	カンキツ
SoOk	静岡県清水市	1989	カラタチ
AcGg	愛知県蒲郡市	1990	カンキツ
WkAt	和歌山県有田郡吉備町	1990	カンキツ

第1表-2 供試虫の来歴

個体群	採集場所	採集年	寄主植物	
<ミカンハダニ>				
TtDe1	鳥取県東伯郡大栄町	1982	ナ	シ
TtDe2	鳥取県東伯郡大栄町	1989	ナ	シ
TtDe3	鳥取県東伯郡大栄町	1990	ナ	シ
SnIm	島根県出雲市芦渡町	1986	ナ	シ
HgKs	兵庫県城崎郡香住町 [Ⓐ]	1985	ナ	シ
OyOy1	岡山県岡山市百枝月	1982	ナ	シ
OyOy2	岡山県岡山市百枝月	1986	ナ	シ
OyOy3	岡山県岡山市百枝月	1990	ナ	シ
OyOk	岡山県邑久郡邑久町	1990	カンキツ	
HsAt1c	広島県豊田郡安芸津町	1982	カンキツ	
HsAt2c	広島県豊田郡安芸津町	1988	カンキツ	
HsAt1p	広島県豊田郡安芸津町	1982	ナ	シ
HsAt2	広島県豊田郡安芸津町	1983	数種植物	
YgHg	山口県萩市	1989	カンキツ	
EhMy1	愛媛県松山市	1979	カンキツ	
TsKu	徳島県勝浦郡勝浦町	1990	カンキツ	
FoYk	福岡県山門郡山川町	1977	カンキツ	
FoAg1	福岡県甘木市長谷山	1982	ナ	シ
FoAg2	福岡県甘木市長谷山	1989	ナ	シ
FoAt	福岡県甘木市高木 [Ⓐ]	1984	ナ	シ
FoKh1	福岡県嘉穂町馬見 [Ⓐ]	1984	ナ	シ
FoTs	福岡県筑紫野市	1989	カンキツ	
SgOg	佐賀県小城郡小城町	1979	カンキツ	
OiKs	大分県東国東郡国東町	1990	カンキツ	
KsTm	鹿児島県垂水市本城	1990	カンキツ	
OnNg	沖縄県名護市名護	1990	カンキツ	
<リンゴハダニ>				
AmKi	青森県黒石市	1987	リ ン ゴ	

[Ⓐ] 越冬卵採集

第3章 ミカンハダニとエステラーゼアイソザイム

Ogita and Kasai (1965) は、寒天ゲル電気泳動法によりミカンハダニとナミハダニの雌成虫 1 個体からでもアイソザイムが検出できることを示した。その後武久・田中 (1967) は、この手法を用いてミカンハダニのエステラーゼを検出する際の泳動距離やゲルの pH、緩衝液のイオン強度および試料の添加法を検討した。また、彼らは九州地方を中心に、少なくとも 3 つの地域から採集されたミカンハダニから、全部で 6 本のエステラーゼ泳動帯を検出した。さらに、この中で各個体群に共通する泳動帯は E_3 、 E_4 および E_5 の 3 本で、 E_1 と E_2 の有無は個体群により異なることを示した。そこで武久・田中 (1967) とほぼ同様の手法により、ミカンハダニのエステラーゼアイソザイムにおける個体群間差異を調査した。非特異的エステラーゼの検出に当たって、基質による分離パターンに差が無い場合は、一般に酢酸 α -ナフチル (α -NA) または β -NA のいずれか一方が基質として用いられる。しかし、ハダニ類に対してこれら両基質を同時に用いて活性の差異を調べた例は桑原 (1982, 1984b) がカンザワハダニについて報告した以外はみあたらない。そこで、 α -NA と β -NA を分解するミカンハダニの非特異的エステラーゼの性質を調べた。

1. 種内にみられるエステラーゼアイソザイムの変異

材料および方法

実験に用いた個体群の中で、KgHt, EhMy1, SgOg および FoYk は採集後、果樹試験場安芸津支場 (広島県豊田郡安芸津町) 内のガラス室 (約 25°C) 内でカンキツ (シュウトウ) の実生苗木を用いて累代飼育した。また、HsAtlc, HsAtlp, OyOyl, TtDel および FoAgl は、採集後、野外での寄主と同じ植物 (カンキツまたはナシ) の葉片上で 1 週間以上室内飼育 (25°C, 16L-8D) した。

電気泳動の支持体はリン酸緩衝液 (pH 8.04, イオン強度 0.02μ) にアガロースとポリビニルピロリドン (PVP; K-90) をそれぞれ 0.7 と 2 % の割合で加え、加熱溶解し、ガラス板 (15×20 cm) 上に厚さ 1 mm に流して作成した。電解槽には pH 8.04, イオン強度 0.1μ のリン酸緩衝液を用いた。各個体群から雌成虫を任意に抽出し、1 個体ずつ 10μ l の蒸留水中でガラス棒を用いてすりつぶした。これをセルロースアセテート膜の小片 (2×15 mm) に 2～3 μ l ずつ吸着させてアガロースゲル上に置き、直ちに電気泳動を開始した。電気泳動は 40 mA 定電流 (200～250 V) で 90 分間行った。泳動終了後、酢酸 β -ナフチル (β -NA) の 1 % アセトン溶液をクロマトスプレーを用いて噴霧した後、約 37°C, 70～90% RH で 60 分間加温し、次い

でFast Blue B塩の0.5%水溶液を噴霧して非特異的エステラーゼの泳動帯を検出した。

また、ナシ寄生個体群 (HsAtlpおよびFoAg1) の卵をカンキツ葉片上に移し、成虫までの発育率と発育した雌成虫のエステラーゼを電気泳動法により検出した。同様に、カンキツ寄生個体群 (FoYk, KgHtおよびHsAtlc) をナシ葉片上で2世代飼育し、世代ごとに雌成虫のエステラーゼを検出した。

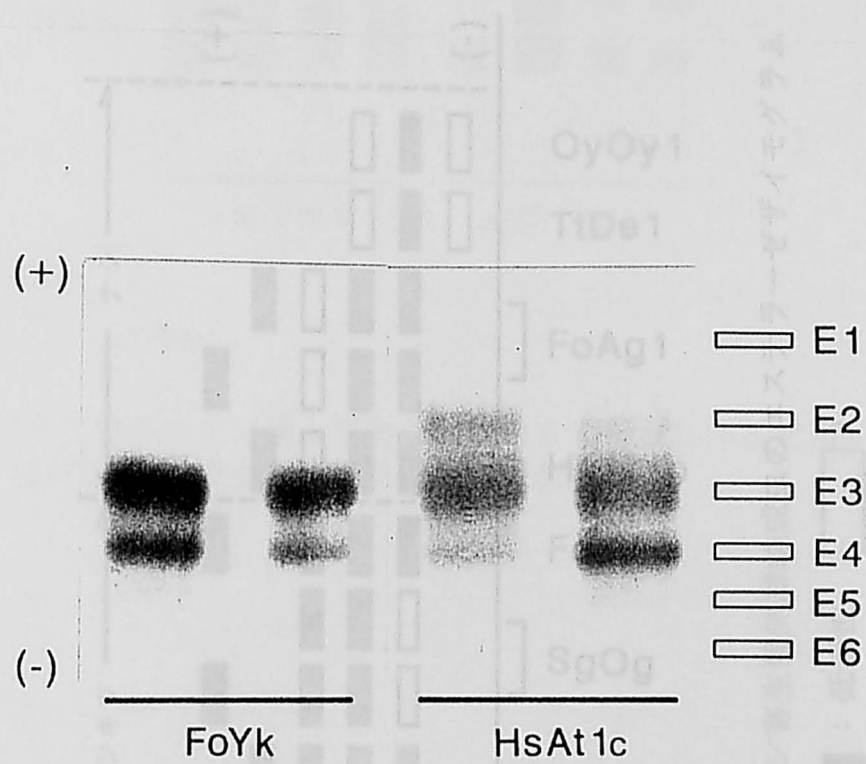
結 果

ミカンハダニの非特異的エステラーゼの活性泳動帯は6本 (易動度の大きいものからE₁~E₆) 検出された (第1図)。FoYkからはE₁, E₃, E₄およびE₅泳動帯が、またHsAtlcからはE₂, E₃, E₄およびE₅が検出された。カンキツ寄生個体群ではE₁からE₆まで計5本のバンドがみられ、これらは武久・田中 (1967) が検出したものと同じ泳動帯であると考えられた (第2図)。また、この中でE₃~E₅の3本はいずれの個体群にも共通にみられた点も同様である。一方、ナシ寄生個体群ではカンキツ寄生個体群と基本的に同じパターンを示したものとE₄~E₆までの3本だけが検出された個体群の2つのグループに分けられた。また、カンキツ寄生のものと同じパターンを示した個体群では、カンキツ寄生のものに比べてE₃バンドの活性が低かった。

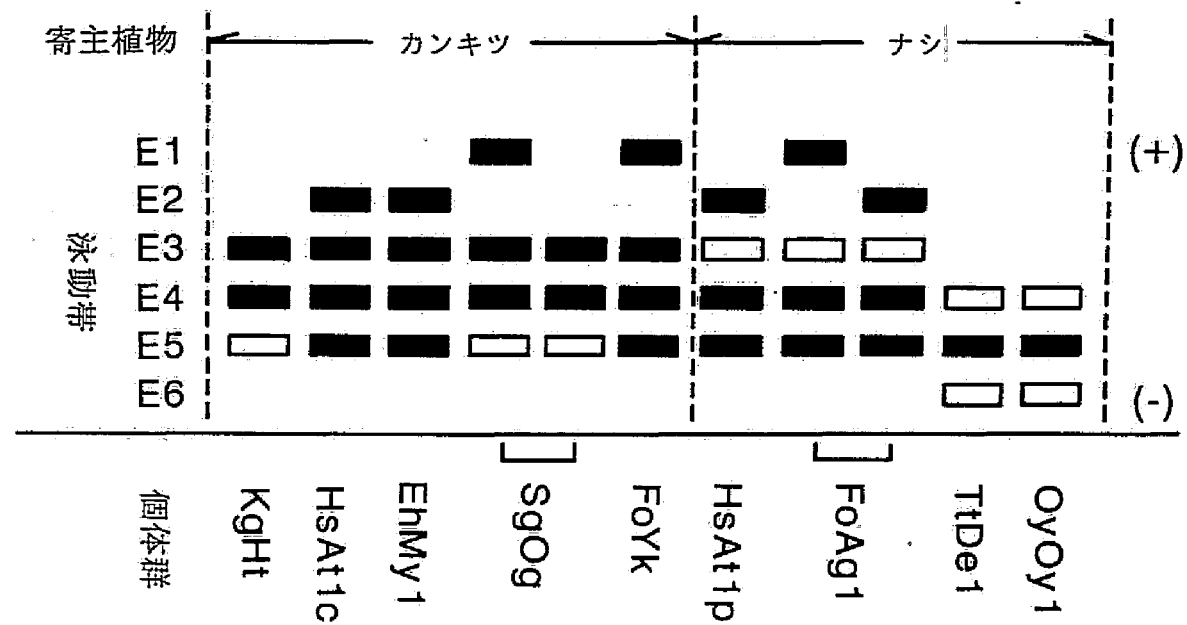
カンキツ寄生個体群と同じエステラーゼ分離パターンを示したHsAtlpとFoAg1のカンキツ葉における発育率はいずれも80%以上と高く、いずれの個体群においても発育した雌成虫のE₃泳動帯の活性はナシで発育したものに比べて明らかに高くなった (第3および4図)。一方、ナシ葉上で発育したFoYkのE₃泳動帯の活性は飼育1世代目ですでに低下し、2世代目の個体ではその活性がさらに低下した (第5図)。KgHtとHsAtlcの両個体群の場合もFoYkと同様に、ナシ葉での飼育1世代目の雌成虫のE₃活性はカンキツ葉で発育した個体に比べて明らかに低かった。

考 察

カンキツ寄生個体群と、これらと同じ分離パターンを有するナシ寄生個体群との間にみられたE₃泳動帯の活性の差異は寄主植物を変えた場合に解消されることから、この違いは遺伝的なものではなく寄主植物の影響によるものと考えられる。したがって、ミカンハダニから検出されたエステラーゼ分離パターンは第6図に示すI~IVの4つの型に分類することができる。これらのうち、I, IIおよびIII型は武久・田中 (1967) が九州および四国地方のミカンハダニから検出した泳動パターンとほぼ一致する。一方、OyOy1およびTtDelから検出されたIVの型は本実験においてはじめて検出された分離パターンである。森本・高藤 (1983) および

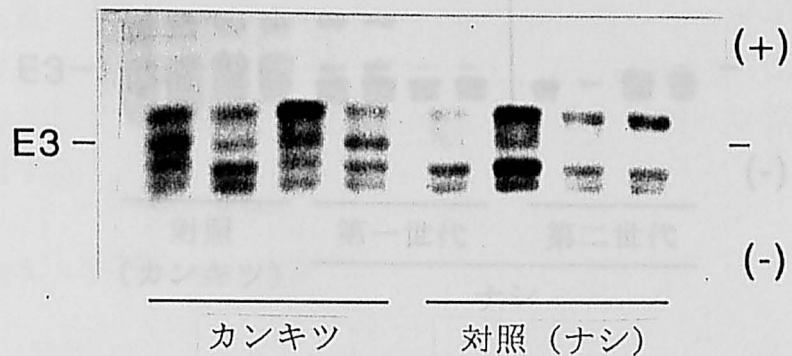


第1図 アガロースゲル電気泳動法により分離された福岡県産 (FoYk) および広島県産 (HsAt1c) ミカンハダニ雌成虫のエステラーゼ泳動像



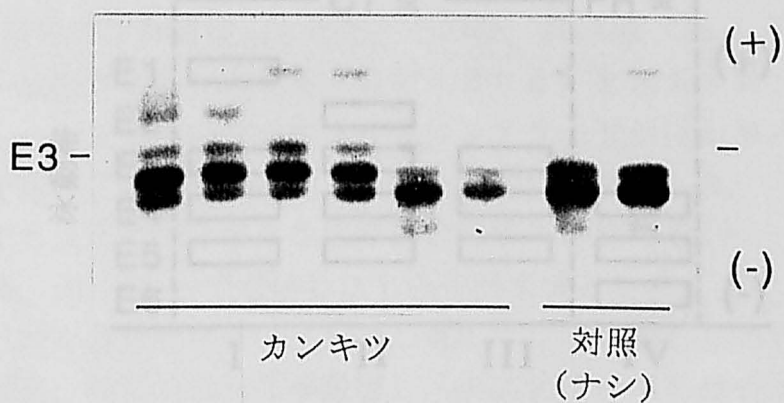
第2図 カンキツおよびナシ寄生個体群雌成虫のエステラーゼザイモグラム

(高活性, : 低活性,)

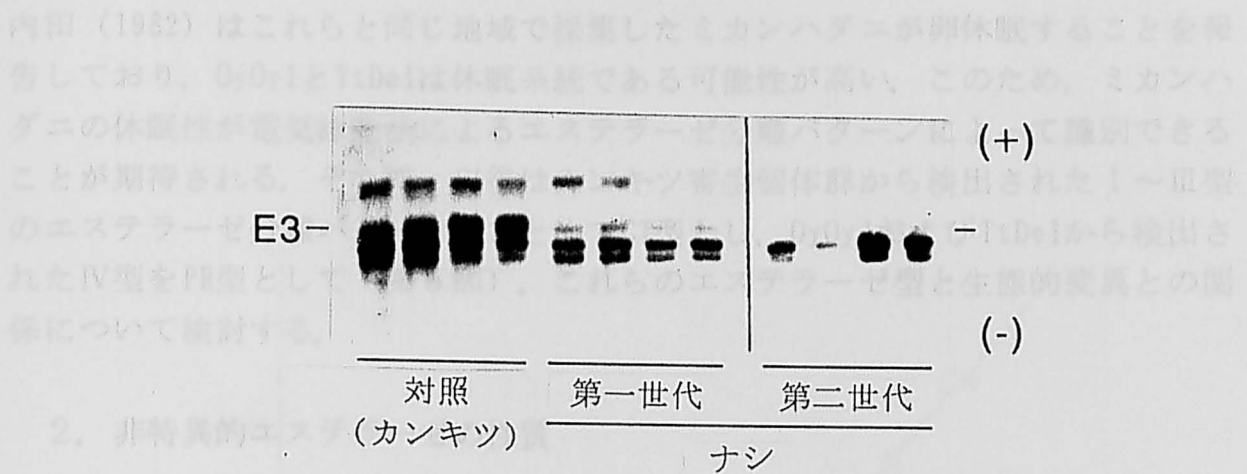


第5図 福岡産カンキツ寄生個体群 (FoAt1) をナシ葉上で2世代飼育した場合の雌成虫におけるE3バンド活性の変化

第3図 カンキツおよびナシ葉上で卵から成虫まで発育した広島産ナシ寄生個体群 (HsAt1p) 雌成虫のエステラーゼ泳動像

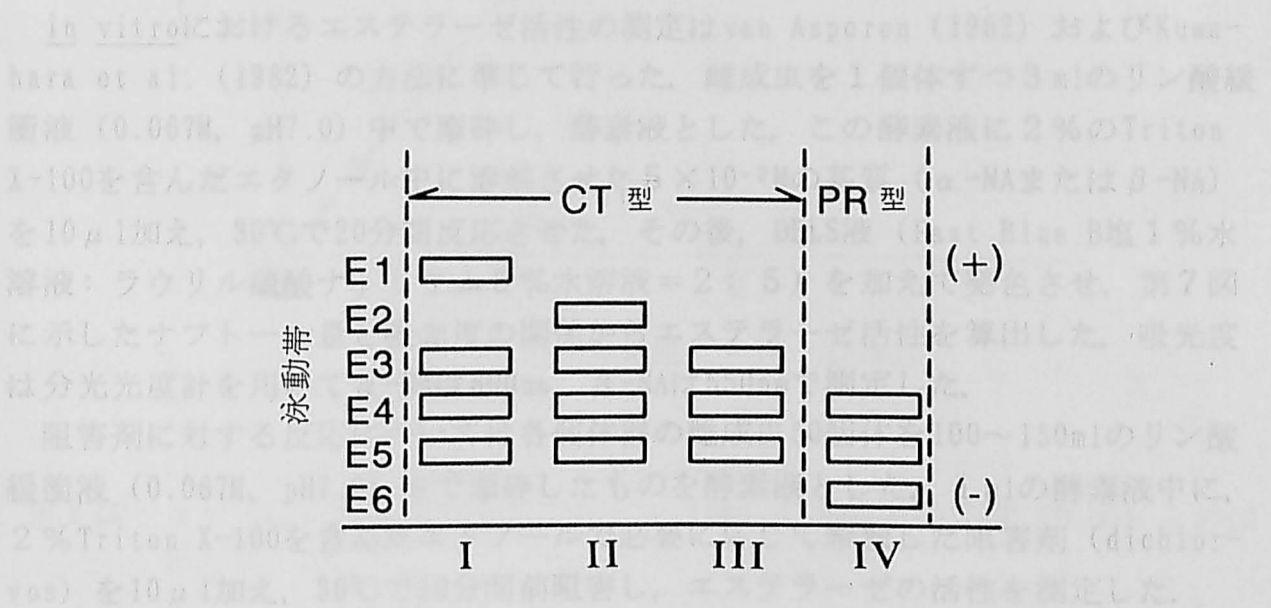


第4図 カンキツおよびナシ葉上で卵から成虫まで発育した福岡産ナシ寄生個体群 (FoAg1) 雌成虫のエステラーゼ泳動像



第5図 福岡産カンキツ寄生個体群 (FoYk) をナシ葉上で2世代飼育した場合の雌成虫におけるE₃バンド活性の変化

TiOclで、
個体群から雌成虫を1個体ずつ抽出し、これらを1個体ずつ10μlの蒸留水中で溶解し、それらをそれぞれ2枚のセルロースアセテート膜片 (2×15cm) に2～3μlずつ吸着させて支持体上に置いた。泳動終了後、2枚の膜片の内一方を泳動した部位にα-Naを、もう一方にはβ-Naを噴霧し、個体毎に両基質に対する活性泳動帯を検出した。



第6図 アガロースゲル電気泳動法によりミカンハダニから検出されたエステラーゼアイソザイムパターン

(第8図)
3本の泳動帯を有し、E₂とE₃はそれぞれE₁とE₂が検出できた (CT型)。こ

内田（1982）はこれらと同じ地域で採集したミカンハダニが卵休眠することを報告しており、OyOy1とTtDe1は休眠系統である可能性が高い。このため、ミカンハダニの休眠性が電気泳動法によるエステラーゼ分離パターンによって識別できることが期待される。そこで、以後はカンキツ寄生個体群から検出されたⅠ～Ⅲ型のエステラーゼ分離パターンをまとめてCT型とし、OyOy1およびTtDe1から検出されたⅣ型をPR型として（第6図）、これらのエステラーゼ型と生態的変異との関係について検討する。

2. 非特異的エステラーゼの性質

材料および方法

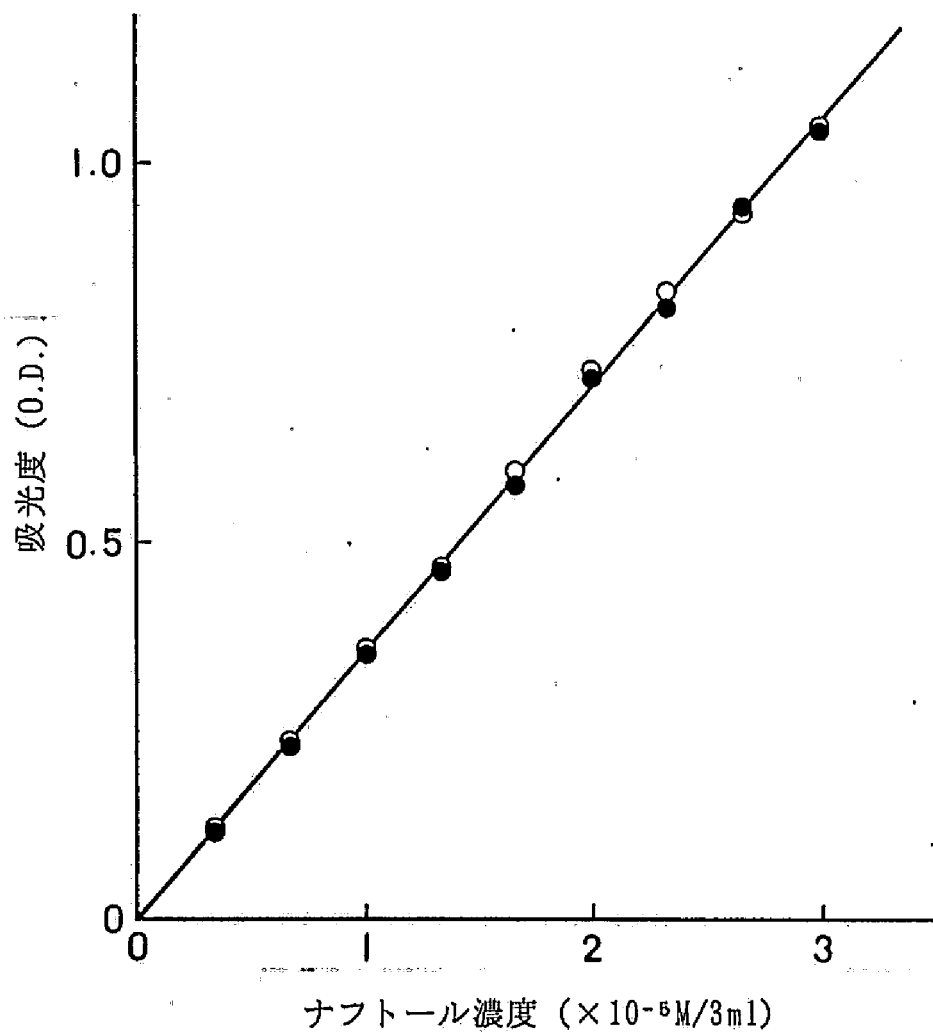
供試した個体群はカンキツ寄生のKgHt, EhMyl, HsAt1cおよびFoYkとナシ寄生のTtDe1で、電気泳動法による分離パターンの検出は基本的に前項と同様である。各個体群から雌成虫を12個体ずつ抽出し、これらを1個体ずつ10 μ lの蒸留水中で摩砕し、それらをそれぞれ2枚のセルロースアセテート膜片（2 \times 15mm）に2 \sim 3 μ lずつ吸着させて支持体上に置いた。泳動終了後、2枚の膜片の内の一方を泳動した部位に α -NAを、もう一方には β -NAを噴霧し、個体毎に両基質に対する活性泳動帯を検出した。

In vitroにおけるエステラーゼ活性の測定はvan Asperen（1962）およびKuwaraha et al.（1982）の方法に準じて行った。雌成虫を1個体ずつ3mlのリン酸緩衝液（0.067M, pH7.0）中で摩砕し、酵素液とした。この酵素液に2%のTriton X-100を含んだエタノール中に溶解させた 5×10^{-2} Mの基質（ α -NAまたは β -NA）を10 μ l加え、30 $^{\circ}$ Cで20分間反応させた。その後、DBLS液（Fast Blue B塩1%水溶液：ラウリル硫酸ナトリウム5%水溶液＝2：5）を加えて発色させ、第7図に示したナフトール量と吸光度の関係からエステラーゼ活性を算出した。吸光度は分光光度計を用いて α -NAは600nm、 β -NAは550nmで測定した。

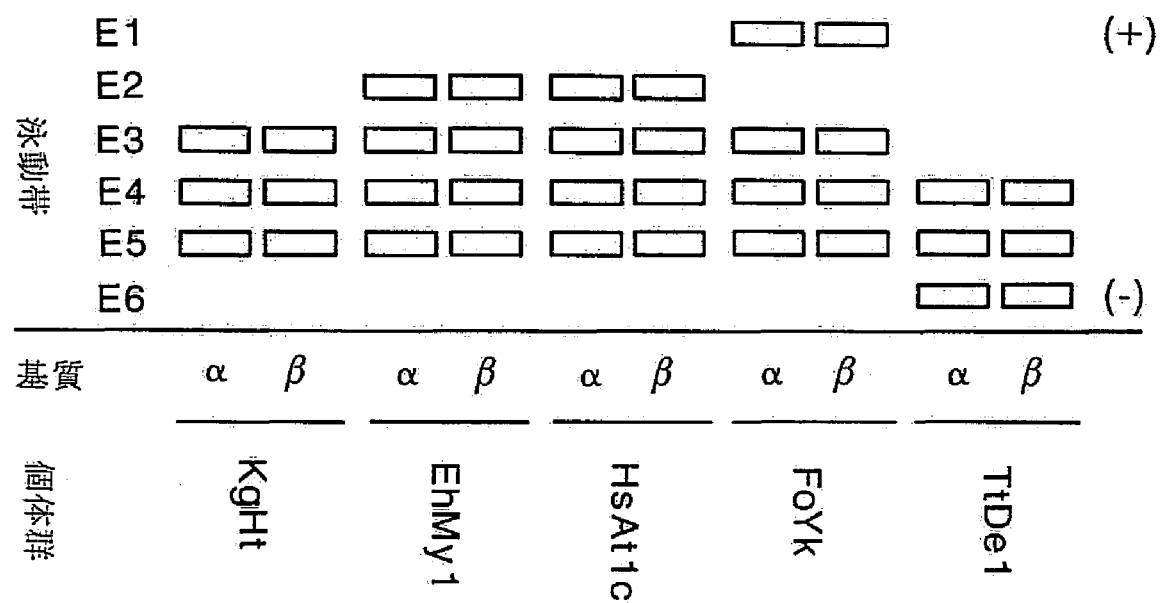
阻害剤に対する反応については各個体群の雌成虫50個体を100 \sim 150mlのリン酸緩衝液（0.067M, pH7.0）中で摩砕したものを酵素液とした。1mlの酵素液中に、2%Triton X-100を含んだエタノールで必要に応じて希釈した阻害剤（dichlorvos）を10 μ l加え、30 $^{\circ}$ Cで10分間前阻害し、エステラーゼの活性を測定した。

結 果

β -NAを用いた場合の分離パターンは前項（第3章－1）に示したものと同様で（第8図）、カンキツ寄生のKgHt, EhMyl, HsAt1cおよびFoYkはいずれもE₃～E₅の3本の泳動帯を有し、EhMylとFoYkではそれぞれE₂とE₁が確認できた（CT型）。こ



第7図 α- (○) およびβ-ナフトール (●) の濃度と吸光度 (O.D.) との関係



第8図 酢酸 α -および β -ナフチルを分解する非特異的エステラーゼのザイモグラム

れに対して、ナシ寄生のTtDelではE₄～E₆の位置に泳動帯が検出された（PR型）。 α -NAにより検出された泳動帯のパターンも β -NAと同様で、CT型およびPR型のいずれも泳動帯の相対的位置に基質間の差異は認められなかった。

CT型の3個体群のエステラーゼ活性は、 α -NAではいずれの個体群間でも有意差が認められ（ $p < 0.01$ ）、活性の高いものからEhMy1, FoYk, KgHtの順であった（第2表）。また β -NAにおいてもKgHtの活性は他の2個体群より有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。このように KgHtの活性が低いのは他の2個体群がそれぞれE₁, E₂を有するのに対して、KgHtはこのいずれの泳動帯も持たないためかも知れない（第8図）。一方、PR型のTtDelのエステラーゼ活性は α -NAと β -NAのいずれにおいてもCT型の3個体群より有意に低かった（ $p < 0.01$ ）（第2表）。

次に、各個体群について α -NAと β -NAに対する活性を比較すると、CT型ではいずれの個体群においても有意差が認められ（ $p < 0.01$ ）、 α -NAに対する活性の方が β -NAに対する活性よりやや高かった。しかし、PR型のTtDelでは基質間の差は認められなかった。

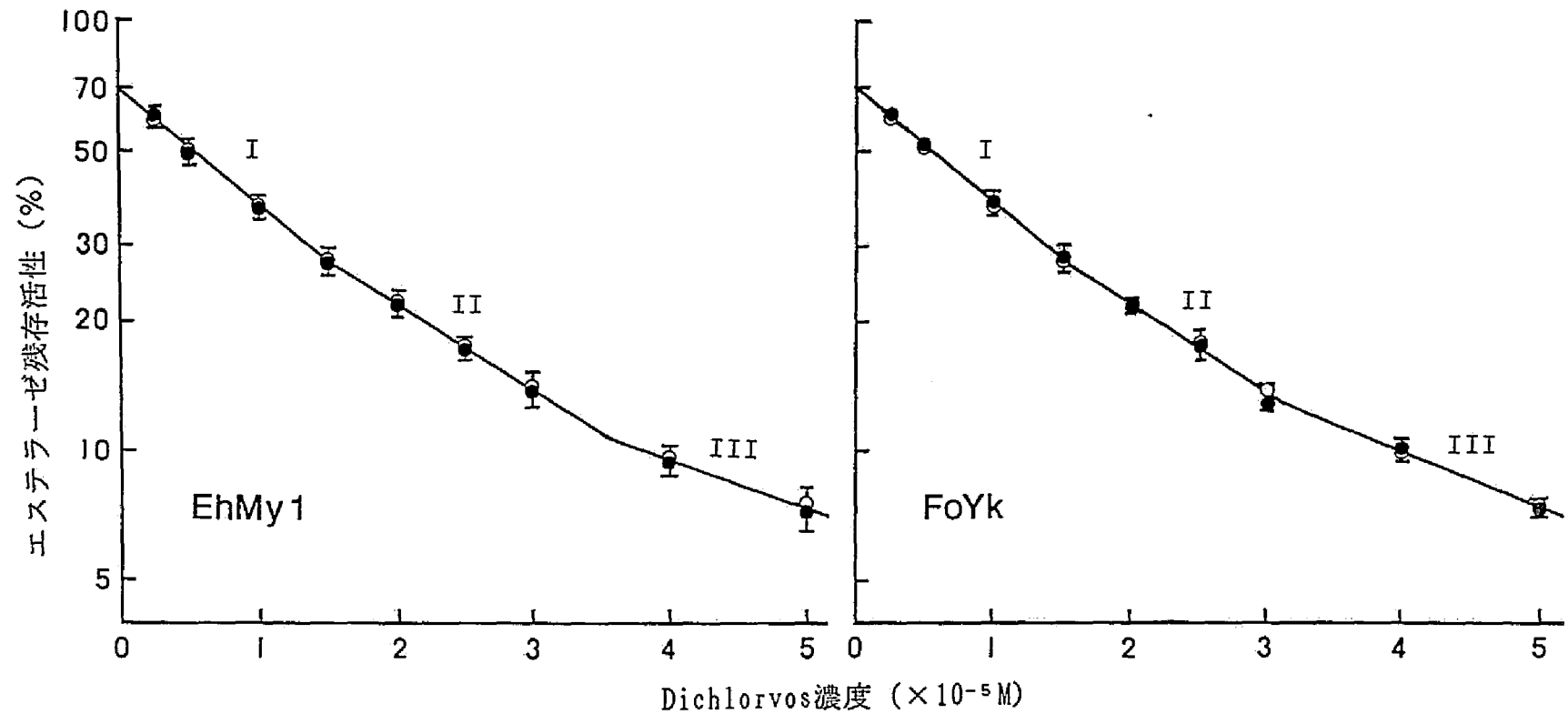
各個体群の非特異的エステラーゼに対するdichlorvosの阻害様式（第9図）は α -NAと β -NAのいずれを基質とした場合もきわめて類似しており、いずれの個体群においても各濃度での阻害程度および縦軸との交点や直線の折れ曲がる位置について基質間の顕著な差異はみられなかった。個体群間ではCT型のEhMy1とFoYkのパターンが類似しているのに対して、PR型のTtDelではこれらCT型に比べて高濃度のdichlorvosによる阻害程度が低く、直線の折れ曲がる位置もやや異なっていた（第10図）。

第2表 *In vitro*における酢酸 α -および β -ナフチルに対するミカンハダニの非特異的エステラーゼ活性（30℃, 20分間）

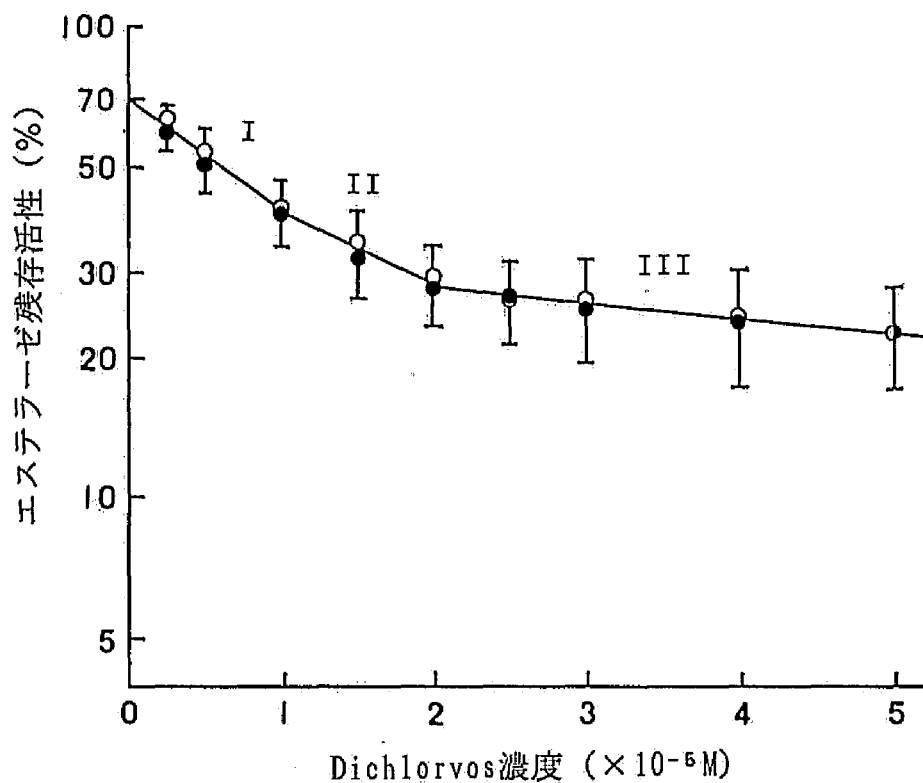
個体群	エステラーゼ型	エステラーゼ活性 ^a				活性比 (α/β)
		α -N A		β -N A		
		平均値 ^b	CV(%)	平均値 ^b	CV(%)	
KgHt	CT	5.01a	5	3.66e	28	1.37
EhMy1	CT	8.25b	27	4.59f	27	1.79
FoYk	CT	6.96c	29	4.95f	22	1.41
TtDel	PR	2.61d	25	2.46d	23	1.06

^a エステラーゼ活性は1雌成虫当りの基質分解量（ 1×10^{-5} M/ml）により、50個体の平均値として示した。

^b 表中のアルファベットが異なるものはt検定で有意差が認められた（ $p < 0.01$ ）ことを示す



第9図 愛媛 (EhMy1) および福岡 (FoYk) 産カンキツ寄生個体群の非特異的エステラーゼに対するdichlorvosの阻害反応 (○, α-NA; ●, β-NA; 縦棒, 99%信頼限界; I, IIおよびIII, 2分子速度定数算出のため分割した直線)



第10図 鳥取産ナシ寄生個体群 (TtDel) 個体群の非特異的エステラーゼに対する dichlorvos の阻害反応 (○, α -NA; ●, β -NA; 縦棒, 99%信頼限界; I, II および III, 2 分子速度定数算出のため分割した直線)

直線が縦軸と100%以下で交差することは、さらに低濃度のdichlorvosによって阻害されるエステラーゼの存在を示唆し、また直線が途中で折れ曲がることは測定範囲内においても阻害剤に対する感受性の異なった酵素が存在していることを示す。これらから、両基質の分解にはdichlorvosに対して異なった感受性を有する複数のエステラーゼが関与していることが伺える。

これらの阻害曲線を99%の信頼区間によって直線部分に分けるとすれば、いずれも2本の直線に区別されるが、ここでは個々の実験データに基づき3本の直線に分けるのが適当と考え、それぞれの個体群について直線I, II, IIIを定めた(第9図, 第10図)。これらの直線から, Aldridge (1950)の方法により2分子速度定数(k_i)を求めた(第3表)。これらを個体群間で比較すると、阻害様式の場合と同様に基質間ではいずれの個体群においても各直線でほぼ近似した数値が得られ、個体群間ではCT型のEhMy1とFoYkが類似しているのに対して、PR型のTtDe1では直線IIの k_i がCT型の直線IIIのそれとほぼ同等であった以外はいずれもやや異なった数値を示した。

考 察

カンザワハダニでは電気泳動法により分離される複数のエステラーゼがNAの分解に関与しており(Kuwahara et al., 1981), α -および β -NAに対するin vitroでの活性は同一系統でほとんど差がない(Kuwahara et al., 1982)。また、これらエステラーゼの電気泳動法による分離パターンや各種阻害剤による阻害様式とそれに対する k_i および阻害物質定数(K_i)なども両基質間でほぼ一致している(桑原, 1982)。これらのことから、カンザワハダニでは α -および β -NAは同

第3表 In vitroでのdichlorvosの非特異的エステラーゼ阻害反応における2分子速度定数(k_i)

個体群	エステラーゼ型	基質	$k_i (\times 10^3 \text{ l/mol/min})$		
			I ^a	II ^a	III ^a
EhMy1	CT	α -NA	2.79	2.29	1.50
		β -NA	2.91	2.31	1.61
FoYk	CT	α -NA	2.86	2.26	1.70
		β -NA	2.81	2.51	1.78
TtDe1	PR	α -NA	2.60	1.61	0.46
		β -NA	2.37	1.75	0.40

^a 第9図および第10図参照

一または極めて類似した酵素群によって分解されているものと考えられる。ミカンハダニにおいても、電気泳動法における易動度ならびにdichlorvosに対する感受性の両面から、複数のエステラーゼがNAの分解に関与していることは明らかである。また、電気泳動法において α -NAと β -NAのいずれを基質に用いた場合にも、分離検出される泳動帯の相対的位置にはまったく差異がみられないことと、dichlorvosによる阻害様式についても各個体群において基質間の差異がほとんどなく、 k_i も近似した数値が得られたことから、両基質を分解するミカンハダニのエステラーゼはほぼ同一の酵素群であると考えられる。

ミカンハダニ雌成虫1個体当りのエステラーゼ活性(30℃, 20分間)はCT型では $3.66 \sim 8.25 \times 10^{-5} \text{M/ml}$ で, Kuwahara et al. (1982)がカンザワハダニについて示した活性($4.08 \sim 7.80 \times 10^{-5} \text{M/ml}$)にほぼ近い。一方, カンザワハダニでは同一系統の α -NAと β -NAに対する活性はほとんど一致しているのに対して, ミカンハダニのCT型では α -NAに対する活性の方が β -NAに対する活性に比べて高いことから, 両者のエステラーゼの基質特異性に若干の相違があるものと思われた。PR型のミカンハダニのエステラーゼ活性はCT型に比べて明らかに低く, また α -NAと β -NAに対する活性がほぼ同等である点でもCT型と異なっていた。またdichlorvosによる阻害様式においてCT型とPR型の間で差異がみられたことは, 電気泳動法による分離パターンの相違と共に, NAを分解する両者のエステラーゼが理化学的性質の点でも異なる酵素群であることを示唆している。これらの点は, エステラーゼ分離パターンの異なるミカンハダニ個体群間の比較をする上で興味深い。

第4章 ミカンハダニの生態的特性の変異とエステラーゼアイソザイム

ミカンハダニの休眠性と寄生性の変異の遺伝的関係を検討するためにはこれらの生態的変異を識別することが可能な指標が必要である。休眠系統が存在する地域で採集された個体群（森本・高藤，1983；内田，1982）のエステラーゼアイソザイムの分離パターンは従来から知られているもの（武久・田中，1967；田中ら，1972）とは明らかに異なる（第3章）。この遺伝的変異はミカンハダニの生態的特性の変異を識別するための有効な指標になる可能性がある。そこで，本章ではミカンハダニの寄生性ならびに休眠性の変異とエステラーゼアイソザイムの変異との関係を検討した。

1. 寄生性の変異とエステラーゼアイソザイム

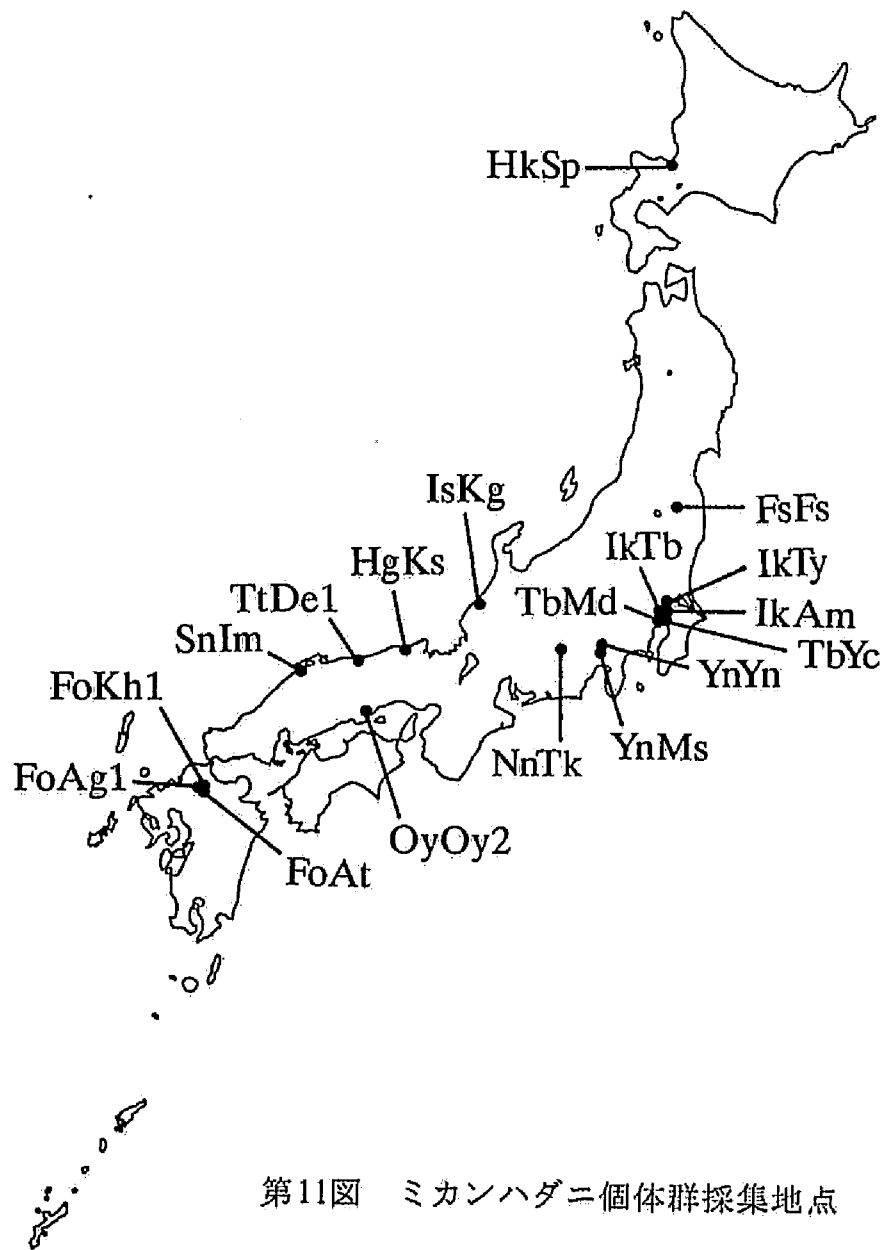
内田（1982）は，ミカンハダニの寄主植物の中で，非休眠系統はカンキツ，ナシ，モモ，スモモ，アズキ，ウメなどでよく発育するのに対し，休眠系統はナシ，モモ，スモモでは発育できるがカンキツ，アズキおよびウメでは発育しないことを示している。真梶（1961b）および森本・高藤（1983）も同様にカンキツでは休眠系統が発育できないことを指摘した。このように，ミカンハダニの寄生性の変異はカンキツ類での発育の可否において顕著に表れるため，カンキツで発育できる個体群をカンキツ寄生型，カンキツでは発育しない個体群をナシ寄生型として分類することができる。本項では各地で採集された個体群についてカンキツでの発育率と電気泳動法によるエステラーゼアイソザイムの分離パターンを調査し，寄生型とエステラーゼ型（CT型およびPR型）との関係を検討した。

a. 各地の個体群の寄生型とエステラーゼ型

材料および方法

福島県から福岡県までの11県から，ナシ園を中心に18地域個体群（第11図）を採集した。全ての個体群は実験に用いるまで寒天ゲル上に置いたナシ葉片（HkSpはクワ葉片）に移し，20ないし25℃の実験室内で飼育した。

カンキツ葉における発育を調べるため，卵が産み付けられたナシまたはクワ（HkSp）葉片を小片に切り分けて20～25℃で2～3日間風乾させ，その葉片を寒天ゲルに乗せたシュウトウ葉片（2×3 cm）上に移し，25℃（16L-8D）の実験室内に置いた。ナシまたはクワ葉片は5～6日後に除去し，10～14日後に発育状況を調査した。



アガロースゲル電気泳動によるエステラーゼ分離パターンの検出は第3章と基本的に同様の方法で行った。ここでは厚さ約0.6mmのゲルを用いて2mA/cm (300～400V) で60～70分間通電した。

結 果

カンキツ（シュウトウ）での発育率が80%以上の7個体群（FsFs, IkTb, NnTk, IkTy, IkAm, TbMdおよびFoAg1）のエステラーゼ型はいずれもCT型で、発育率が10%以下の8個体群（IsKg, TtDel, SnIm, TbYc, HgKs, YnMs, FoAtおよびFoKh1）はPR型であった（第4表）。これらに対して、YnYnおよびOyOy2の発育率はそれぞれ23.9%および11.8%で、両エステラーゼ型の個体が混在していた。そこで、これら2個体群をエステラーゼ型によりサブグループに分け、それぞれについてカンキツでの発育率を再調査した。その結果、いずれもCT型のサブグループのカンキツでの発育率は90%以上と高く、一方PR型は10%以下であった（第5表）。

また、北海道のヤマグワから採集されたHkSpの発育率は0%で（第4表）ナシ寄生型であったが、エステラーゼ活性が低いためアガロースゲル電気泳動法では

第4表 ミカンハダニ地域個体群のカンキツ葉での発育率とエステラーゼ型

個体群	寄主植物	カンキツでの発育 ^a				エステラーゼ型 ^b		
		供試虫数	発育率	死亡率	逃亡率	供試虫数	CT型	PR型
FsFs	カラタチ	222	96.8%	1.8%	1.4%	28	○	
IkTb	ナシ	258	96.1	1.2	2.7	12	○	
NnTk	ナシ	121	95.0	4.2	0.8	8	○	
IkTy	ナシ	56	92.9	7.1	0	12	○	
IkAm	ナシ	86	91.9	2.3	5.8	15	○	
TbMd	ツゲ	62	87.1	4.8	8.1	8	○	
FoAg1	ナシ	96	83.3	2.1	14.6	10	○	
YnYn	モモ	226	23.9	52.7	23.5	23	○	○
OyOy2	ナシ	628	11.8	60.8	27.4	46	○	○
IsKg	ナシ	42	9.5	47.6	42.9	15		○
TtDel	ナシ	215	6.0	46.0	47.9	33		○
SnIm	ナシ	117	3.5	37.6	59.0	8		○
TbYc	ナシ	101	1.0	70.3	28.7	8		○
HgKs	ナシ	1191	0.3	57.4	42.3	33		○
YnMs	ナシ	98	0	81.6	18.4	14		○
FoAt	ナシ	242	0	62.4	37.6	20		○
FoKh1	ナシ	212	0	66.0	34.0	20		○
HkSp	ヤマグワ	132	0	22.0	78.0	—	?	

^a 幼虫から成虫への脱皮までの発育, ^b 第6図参照

第5表 山梨産モモ寄生個体群 (YnYn) および岡山産ナシ寄生個体群 (OyOy2) のエステラーゼ型の異なるサブグループのカンキツ (シュウトウ) での発育率

個体群	エステラーゼ型	供試虫数	発育率	死亡率	逃亡率
YnYn	CT	176	92.0%	4.0%	4.0%
	PR	88	9.1	70.5	20.5
OyOy2	CT	92	95.7	4.3	0
	PR	258	1.6	81.0	17.4

エステラーゼ型が判定できなかった。

b. ナシ寄生型個体群におけるエステラーゼ活性の変異

前項でHkSp個体群のエステラーゼ型が判定できなかったことから、ナシ寄生型個体群間にエステラーゼ活性の差異がある可能性が考えられた。このため、HkSpのエステラーゼ活性を他の個体群と *in vitro* で比較した。

材料および方法

供試した個体群はHkSpとCT型のFoYk、およびOyOy2のPR型のサブグループ (OyOy2': 第4章-1-a参照) である。雌成虫を5個体ずつ1mlのリン酸緩衝液 (0.1M, pH7.0) 中で摩砕し、Sephadex G-25およびろ過膜 (孔径0.45 μ m) を用いて遠心ろ過 (2,000g) した。このろ液をサンプルとしてタンパク量当りのエステラーゼ活性を調査した。タンパクの定量は色素結合法 (藤條, 1980) を用いて, Oliver et al. (1951) の方法により行った。ろ液0.5mlにクマジープリリアントブルー溶液 (バイオラッド社製) 0.5mlを加え, 分光光度計により595nmでの吸光度を測定し, ウシのガンマグロブリンをもとに作成した検量線からタンパク量を決定した。

In vitro におけるエステラーゼ活性は50~150 μ lのろ液をリン酸緩衝液で1mlに希釈し, 第3章-2と同様の方法で測定した。また, タンパク量およびエステラーゼ活性の測定は, それぞれの個体群について3反復ずつ行った。

結 果

タンパク量当りのエステラーゼ活性は (第6表), α -および β -NAのいずれを基質に用いた場合にも, カンキツ寄生型のFoYkが他の2個体群に比べて7~19倍高

第6表 寄生型の異なるミカンハダニ雌成虫の *in vitro* におけるエステラーゼ活性

個体群	エステラーゼ型	寄生型	寄主植物 ^a	タンパク量 (μ g/ml)	エステラーゼ活性 ^b		活性比 (α/β)
					α -NA	β -NA	
FoYk	CT	カンキツ	C	6.63 (6.13-7.00)	4.96 (4.52-5.26)	4.21 (3.92-4.42)	1.18
OyOy2'	PR	ナシ	V	12.61 (11.53-13.27)	0.63 (0.54-0.77)	0.61 (0.51-0.78)	1.03
HkSp	?	ナシ	M	7.21 (6.63-7.56)	0.26 (0.26-0.26)	0.31 (0.28-0.34)	0.84

表中の () 内の数字は最小および最大値を示す

^a C, シュウトウ; V, インゲンマメ; M, クワ

^b 活性はタンパク 1 μ g 当り 1 分間の酢酸ナフチル (NA) 分解量 (1×10^{-9} mol NA 分解量/タンパク (μ g)/分) により示した。

かった。一方、ナシ寄生型の中でも個体群間で顕著な差がみられ、HkSpの活性はOyOy2'の1/2またはそれ以下であった。 α -NAと β -NAに対する活性の比は、FoYkとOyOy2'ではいずれも1以上であった。しかし、HkSpではこれらの関係が逆転し、活性比は0.84であった。

c. ま と め

ミカンハダニのカンキツへの寄生性はエステラーゼ型と密接な関係があり、CT型の個体群はカンキツで発育するカンキツ型で、PR型はカンキツでは発育できないナシ寄生型であることが明らかになった。また、YnYnおよびOyOy2の2個体群のように寄生性の異なる個体が混在する場合でも、エステラーゼ型を基にカンキツに対する寄生性の異なるサブグループに分けることができた。このことは、ミカンハダニの寄生性の分化が遺伝的に安定していることを示すものであり、エステラーゼ型から逆に寄生型を判別することが可能であると考えられる。

一方、北海道のヤマグワから採集したHkSp個体群はナシ寄生型であることがカンキツでの発育率から明らかである。しかし、この個体群についてはアガロースゲル電気泳動法によるエステラーゼ型は判定できなかった。*In vitro*の実験から、この原因はHkSp個体群のエステラーゼ活性が顕著に低いためであることが明らかになった。したがって、このようにエステラーゼ活性が顕著に低い個体群も含めて生態的特性とエステラーゼ型との関係を検討するためには、アガロースゲル電気泳動法よりも感度の高い検出法の検討が必要である。

2. 休眠性の変異とエステラーゼアイソザイム

休眠系統において休眠が誘起される臨界日長は20℃で13時間前後である（真梶・内田，1980；内田，1982；Fujimoto and Takafuji, 1988）。そこで，各個体群の短日条件下における卵休眠誘起の有無とエステラーゼ型との関係を調べた。

また，第4章-1-aにおいて，活性の低い個体群のエステラーゼ型を判別するのにアガロースゲル電気泳動法だけでは不十分であることが明らかになった。このため，ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりミカンハダニのエステラーゼアイソザイムを検出し，検出感度をアガロース法の場合と比較した。

a. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるエステラーゼアイソザイムの分離

材料および方法

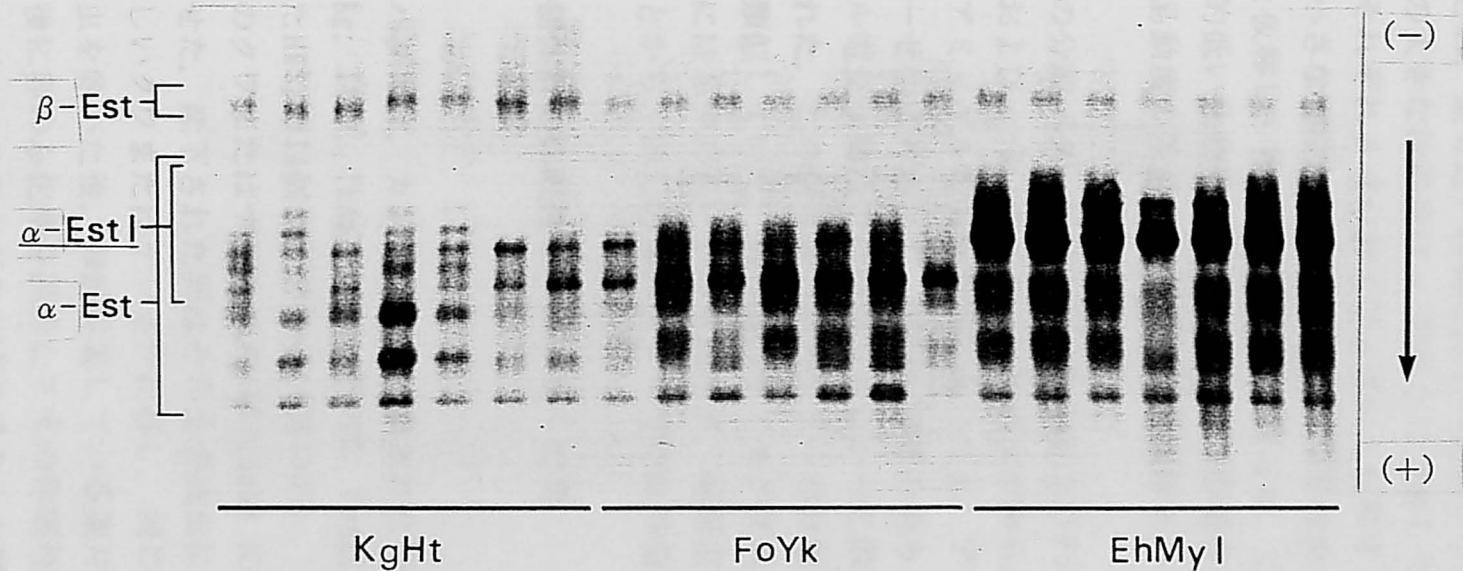
供試した個体群は，CT型（カンキツ寄生型）のKgHt，EhMy1およびFoYk，PR型（ナシ寄生型）の0y0y2'およびナシ寄生型でエステラーゼ型が不明のHkSpである。

電気泳動法は基本的にAotsuka and Asami (1979)の方法と同様である。ゲル（幅160×高さ150×厚さ0.5mm）はLaemmli (1970)に準じてSDSを含まないものを調整した。ゲルの緩衝液系は濃縮ゲルと分離ゲルでそれぞれ0.25M (pH6.8) および0.375M (pH8.8) のトリス-塩酸緩衝液で，電極用緩衝液は0.025Mトリス-0.192Mグリシン緩衝液である。

各個体群から雌成虫を任意に取り出し，10 μ lのトリス-塩酸緩衝液（10mM，pH6.8；20%グリセリンおよび0.002%BPBを含む）中で1個体ずつ摩砕し，孔径0.45 μ mのろ過膜を用いて遠心ろ過したものをサンプルとした。酵素活性に応じて4～8 μ lのサンプルをアプライしたゲルを約5℃の水槽に入れ，40mA定電流で60～70分間通電してタンパクを泳動させた。泳動終了後， α -および β -NA（ 5×10^{-3} M）とFast Blue RR塩（0.2%）を含んだ0.16Mリン酸緩衝液（pH7.0）に室温でゲルを20～30分間浸して泳動帯を検出した。基質と発色剤はそれぞれエタノール（2% Triton X-100）と蒸留水に溶解後，緩衝液と混合した。

結 果

CT型個体群においてはいずれもアガロースゲル電気泳動法に比べて泳動帯数が多く，ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の方がエステラーゼの分離および検出感度が高いと思われた（第12図）。ポリアクリルアミドゲルを用いた場合もアガロースゲルの場合と同様に， α -および β -NAのいずれを基質に用いても同じ位置



第12図 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検出されたCTタイプ飼育個体群のエステラーゼ多型

に泳動帯が得られた。しかし、これらの基質を混合して用いた場合、基質特異性の相違から色調の異なる泳動帯がみられた。このことは、基質特異性が異なる酵素の存在が示唆され、最も遅い泳動帯はその色調から β -NA をより速やかに分解し、それより易動度の大きな泳動帯は α -NA を主に分解していると考えられた。そこで以後はこれらをそれぞれ β -Est および α -Est と仮称する。 α -Est ではバンド数が多く、易動度の小さな部位において明らかな多型性が示された。このため、この部位を α -Est1 と仮称し、後に遺伝子分析を行った。これに対して、 β -Est では単一で活性が比較的低い泳動帯が検出された。この場合も、泳動帯の易動度に違いがみられたが、易動度の差が小さすぎてホモ個体とヘテロ個体の識別が困難であった。

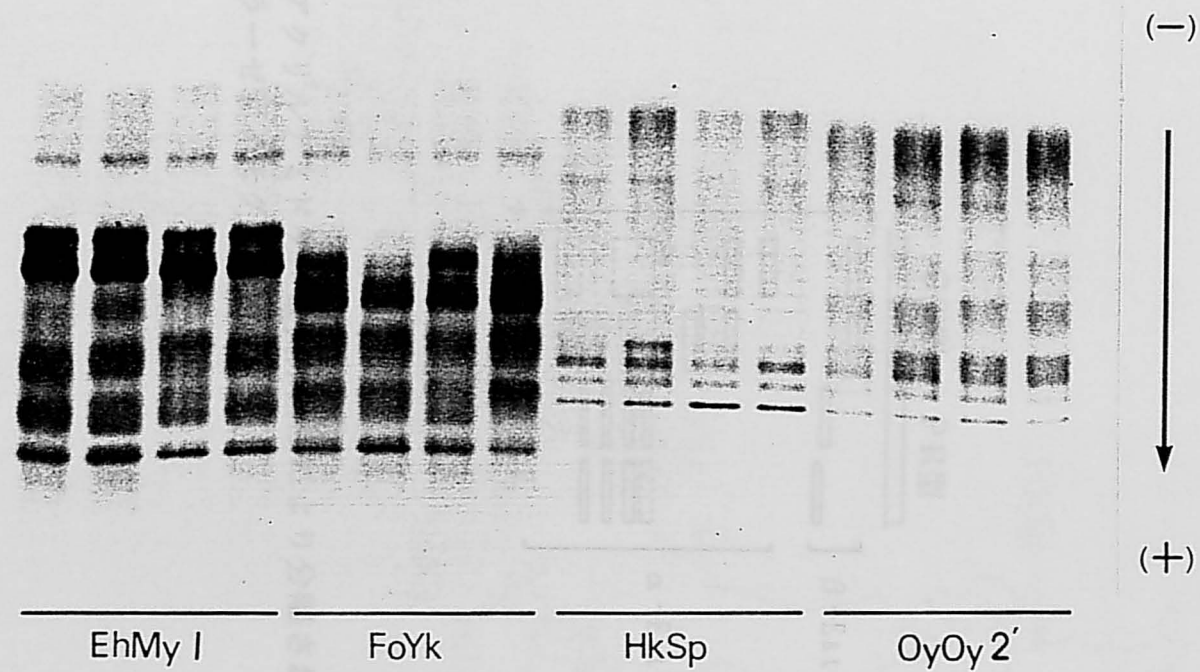
PR型の 0y0y2' の分離パターンは CT型の KgHt および FoYk と顕著に異なり、 β -Est の泳動帯の位置および α -Est のパターンに相違がみられた (第13図)。このようにポリアクリルアミドゲル電気泳動法においても、アガロースゲル電気泳動法におけるエステラーゼ型に対応して、CT型とPR型の明らかな相違が検出できる。

アガロースゲル電気泳動法では検出できなかった HkSp 個体群においても明瞭な泳動帯が検出された。この個体群のエステラーゼ分離パターンは PR型の 0y0y2' のものときわめて類似していた。第14図のザイモグラムに示したように、 β -Est の泳動帯の易動度には多少の違いがみられたが、同程度の相違は CT型内にもみられる (第12図) ことから、HkSp のエステラーゼ型は PR型と考えられる。

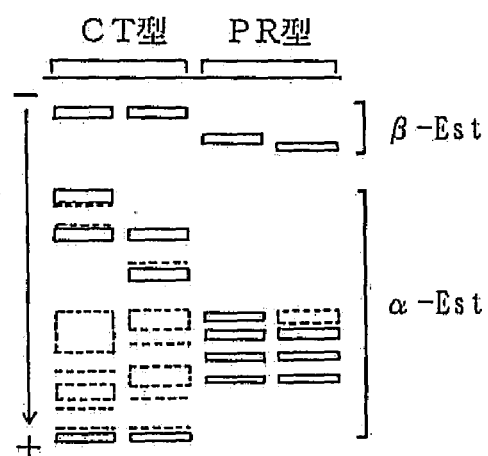
b. 各地の個体群の休眠性とエステラーゼ型

材料および方法

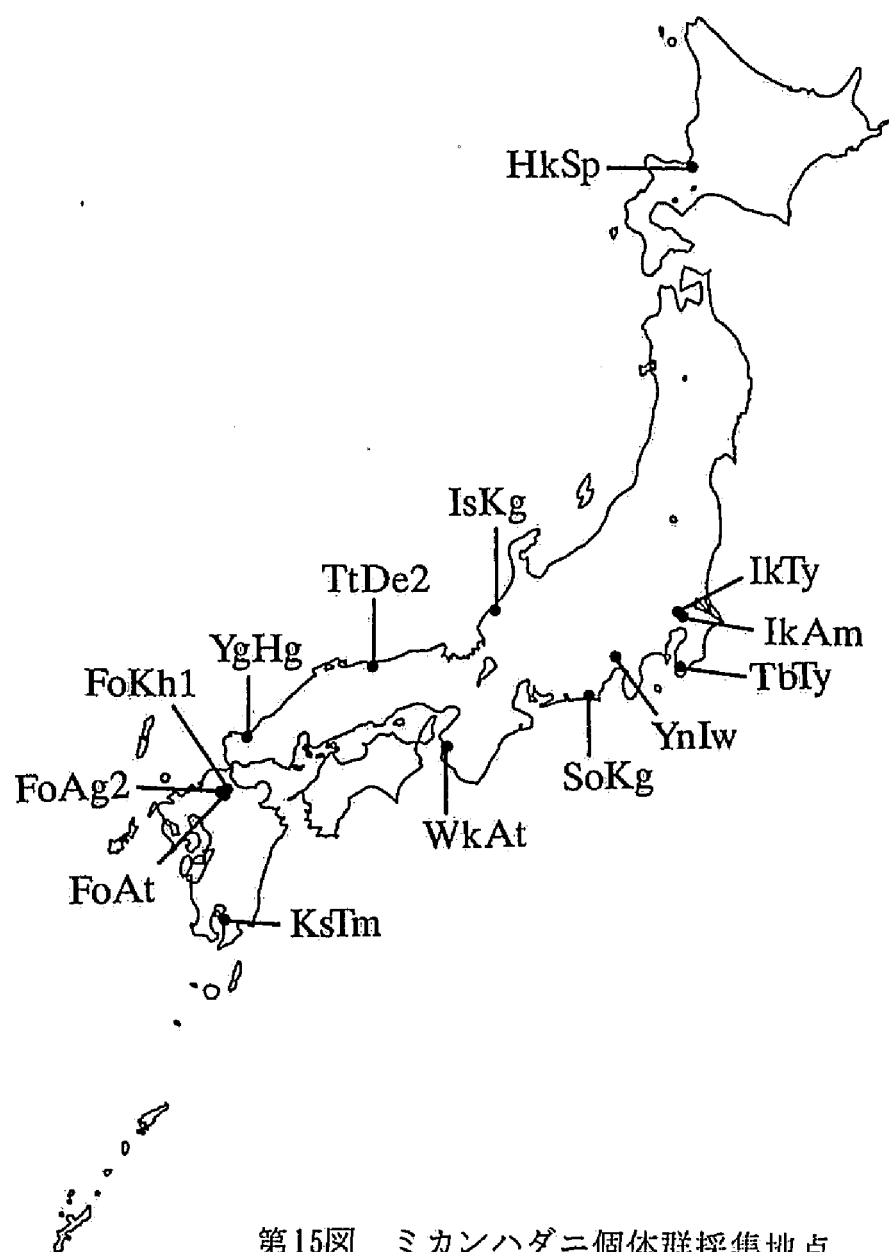
用いたミカンハダニは、カンキツから採集された TbTy, SoKg, YgHg, WkAt, KsTm, ナシの IsKg, IkTy, IkAm, Ynlw, TtDe2, FoAg2, FoAt, FoKh1 およびヤマグワから採集された HkSp の14個体群である (第15図)。各個体群の雌成虫20~30個体を寒天ゲル上のクワまたはナシの葉片 (5×5cm) に移し、20℃短日 (11L-13D) 条件下で産卵させた。産下された卵はそのまま成虫になるまで飼育を続け、発育した雌成虫を新しいクワまたはナシ葉片に移し、同じ短日条件下で3~7日間産卵させた。雌成虫を除いた後、卵が付着している葉片を25℃長日 (16L-8D) 条件下に移し、10日後に卵のふ化率を調査してその休眠性を判定した。エステラーゼアイソザイムはアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検出した。



第13図 北海道産ナシ寄生型HkSp個体群とCT型 (EhMy1, FoYk) およびPR型 (OyOy2') 個体群のポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるエステラーゼ泳動像



第14図 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離されたミカンハダニのエステラーゼザイモグラム



第15図 ミカンハダニ個体群採集地点

結 果

卵のふ化率は個体群間で顕著な差が認められ（第7表），HkSp, IkKg, TtDe2, FoAg2およびFoKh1の5個体群ではふ化幼虫がみられなかったのに対して，その他の個体群ではいずれも80%以上の卵がふ化した。したがって，前の5個体群は休眠系統で卵が休眠しており，休眠が誘起されなかった後の9個体群は非休眠系統であると判定された。また，各個体群のエステラーゼ型はCT型またはPR型の一方に固定しており，非休眠系統の9個体群ではすべてCT型で，休眠系統の5個体群ではPR型であった。

c. ま と め

各個体群のエステラーゼ型と卵のふ化率との関係は明瞭であった。Takafuji and Fujimoto (1985) およびTakafuji (1988) はカンキツおよびナシから採集されたミカンハダニの休眠性の異なる系統間に完全な生殖的隔離があることを明らかにした。このことは，ミカンハダニの休眠性が遺伝的に完全に分化していることを示唆するものである。これらのことから，ミカンハダニの休眠性は，寄生性と同様にエステラーゼ型によって完全に識別できると考えられる。エステラーゼ

第7表 20℃短日（11L-13D）条件下で産下されたミカンハダニ地域個体群の卵のふ化率（25℃，16L-8D）とエステラーゼ型

個体群	寄主植物	雌成虫数	供試卵数	ふ化率	エステラーゼ型		
					供試虫数	CT	PR
TbTy	カンキツ	20	154	98.7%	74 ^b	○	
IkAm	ナ シ	36	223	96.9	9 ^a	○	
YnIw	ナ シ	20	273	96.7	114 ^b	○	
FoAg2	ナ シ	20	79	94.5	73 ^b	○	
SoKg	カンキツ	20	67	94.0	88 ^b	○	
YgHg	カンキツ	20	224	92.0	91 ^b	○	
IkTy	ナ シ	33	260	89.6	12 ^a	○	
WkAt	カンキツ	27	17	88.2	90 ^b	○	
KsTm	カンキツ	40	92	84.8	129 ^b	○	
HkSp	ヤマグワ	49	48	0	35 ^b		○
IsKg	ナ シ	3	11	0	15 ^a		○
TtDe2	ナ シ	23	19	0	62 ^b		○
FoAt	ナ シ	60	26	0	9 ^a		○
FoKh1	ナ シ	62	34	0	9 ^a		○

^a アガロースゲル電気泳動法

^b ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

型と寄生性との関係についてはすでに第4章-1で述べた。すなわち、CT型はカンキツ寄生型（カンキツで正常に発育するもの）であり、PR型はナシ寄生型（カンキツでは正常に発育できないもの）である。また、エステラーゼ活性の低いHkSpはカンキツでは発育できないことがわかっている。これらを本項の結果と総合すると、CT型は非休眠系統でカンキツ寄生型の個体群であり、PR型は休眠系統でナシ寄生型の個体群である。このことは、ミカンハダニの休眠性と寄生性の連鎖を示しており、ミカンハダニの休眠性と寄生性に関するこれまでの報告（真梶，1961b；内田，1982；森本・高藤，1983）を支持するものである。また、電気泳動法では個体ごとにこれらの生態的変異を識別できるため、休眠性および寄生性の異なる個体が混在している場合（Takafuji and Morimoto, 1983；真梶ら，1986）や山田・野田（1985）が報告しているようにそれまで発生が認められなかった地域に休眠系統が発生するようになった場合にもこれら2系統を明瞭に識別できる。

第5章 エステラーゼ型が異なるミカンハダニ個体群間にみられる形態的変異

ミカンハダニの生態的変異を個体ごとに判別する手法がこれまで確立されていなかったため、生態的特性の異なる個体群間における形態的変異に関する研究はあまり進んでいない。これまでには、卵径の相違（内田，1982）と雌成虫の体色の若干の相違（真梶，1961a）が知られているだけである。本章ではエステラーゼ型により生態的特性を識別した個体群について、走査型電子顕微鏡ならびに生物顕微鏡による形態的変異の調査を行った。

1. 走査型電子顕微鏡による微細構造の比較

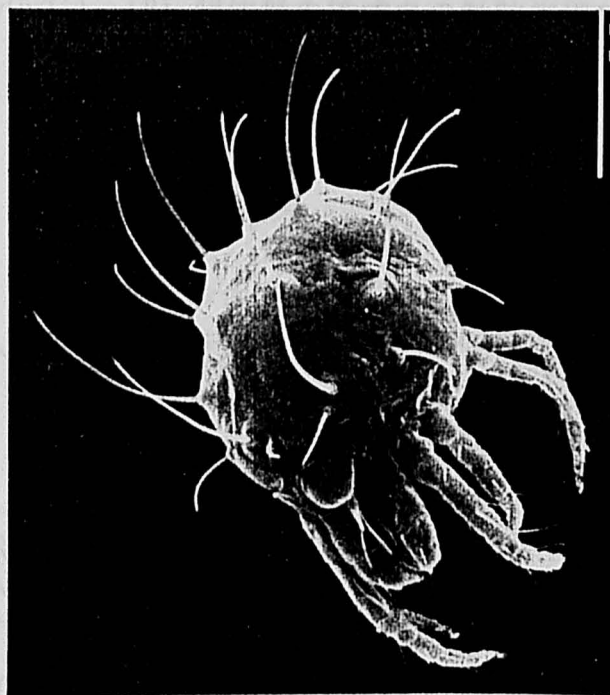
材料および方法

観察に用いた個体群はCT型のKgHt, EhMy1およびFoYkとPR型のHkSp, TtDe2およびOyOy2'とリンゴハダニのAmKiである。これらはいずれも半年間以上、実験室内または隔離ガラス室内で継続飼育している個体群である。雌成虫をメタノール・酢酸混合液（メタノール：酢酸：水＝1：3：1）で30分間処理した後エタノールで脱水処理し、順次アセトン、酢酸イソアミルに置換した。これらを臨界点乾燥後、金を蒸着させて走査型電子顕微鏡により外部形態を観察した（第16図）。観察は雄成虫の触肢先端部、雌成虫の爪間体（第1脚）および周気管の形態について行った。

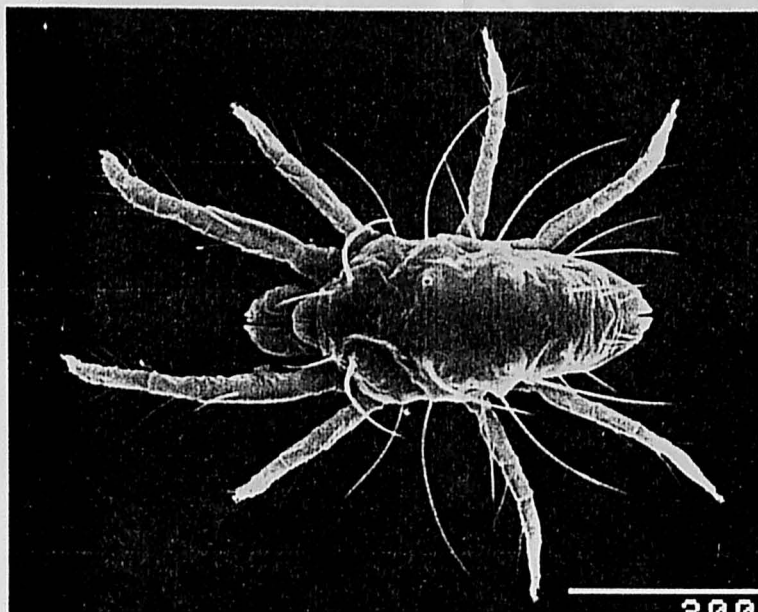
結 果

雄成虫触肢先端部の毛の配置等に関して、エステラーゼ型間における基本的な相違はみられなかった（第17および18図）。しかし、吐糸腺（第18図，矢印）はCT型個体群に比べてPR型個体群の方が大きく、相対的によく発達していた。CT型個体群の周気管は末端部からほぼ4 μ mの部位で幅が広がり、末端に向けて細長い形をしているのに対して、PR型では末端が広がり楕円形に近い形であった（第19および20図）。また、リンゴハダニの周気管はPR型と同様に末端部が広がっていた（第20図）。CT型およびPR型の爪間体はいずれも爪状で3対の腹毛を有するが、CT型では爪状の部位と腹毛（基部から2番目）との角度がほぼ直角であるのに対して、PR型ではこの角度が90度より顕著に小さかった（第21および22図）。

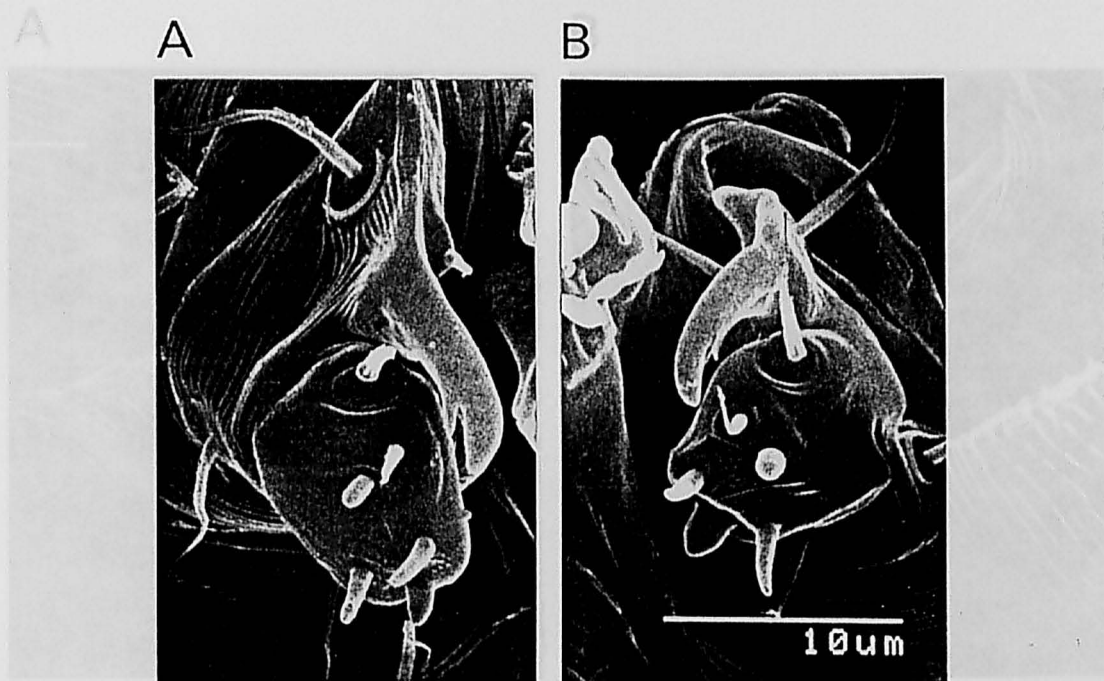
A



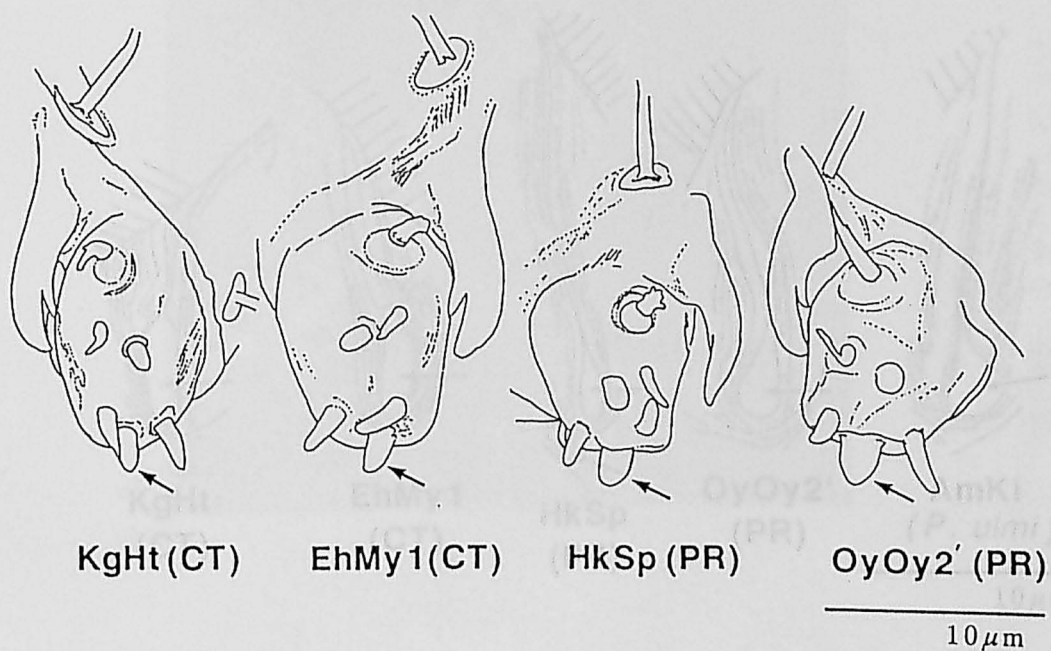
B



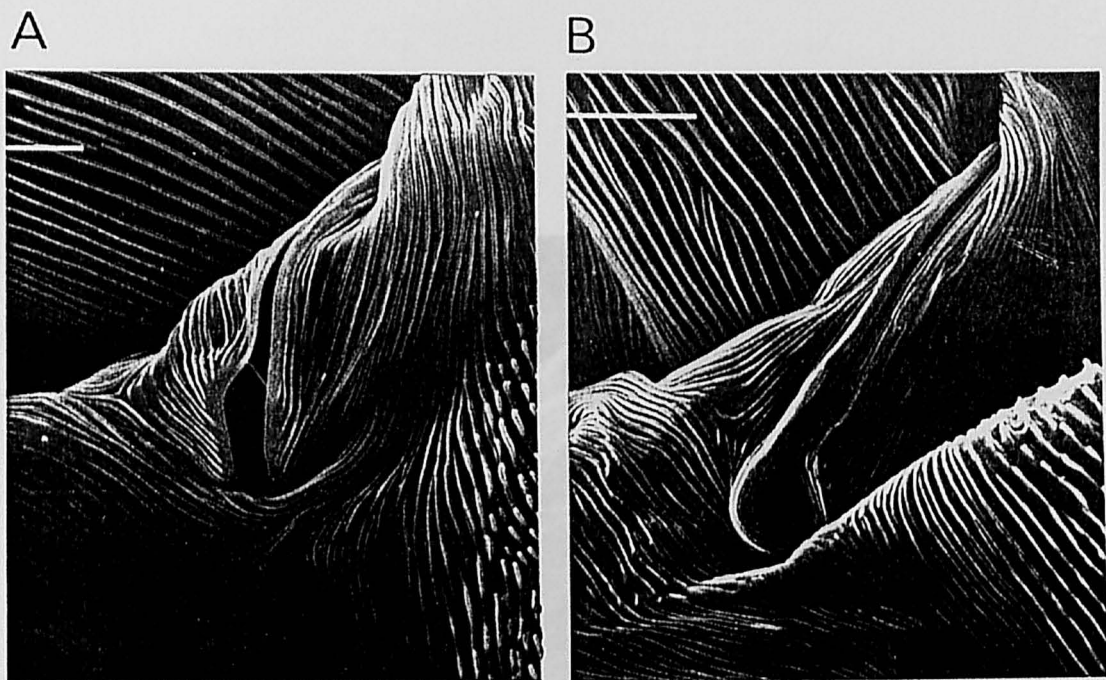
第16図 ミカンハダニ雌 (A) および雄 (B) 成虫の走査型電子顕微鏡像



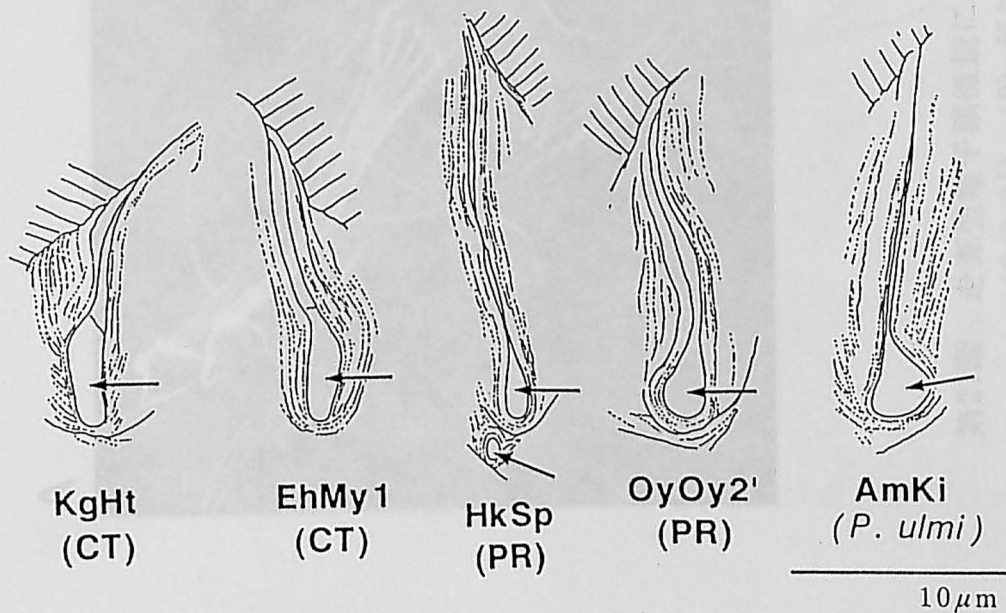
第17図 走査型電子顕微鏡により観察されたCT型 (EhMy1) (A) およびPR型 (OyOy2') (B) 個体群の雄成虫の触肢先端部



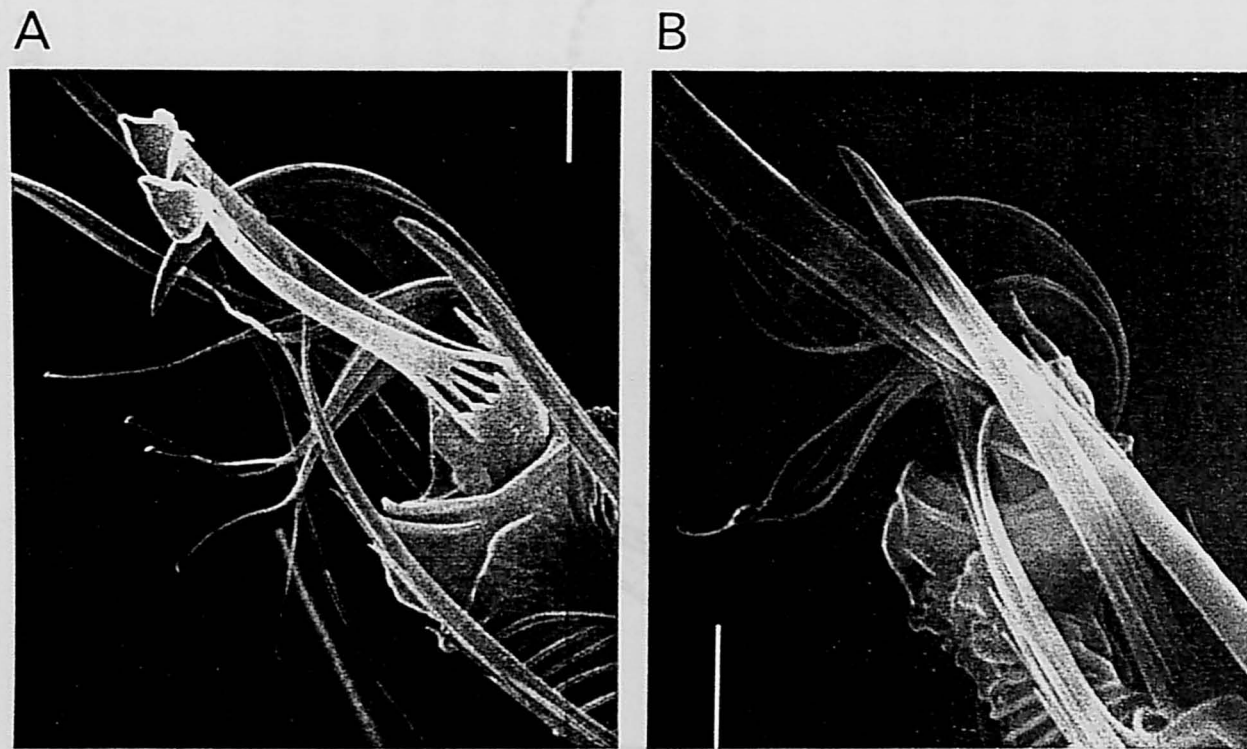
第18図 CT型およびPR型個体群の雄成虫の触肢先端部の形態比較



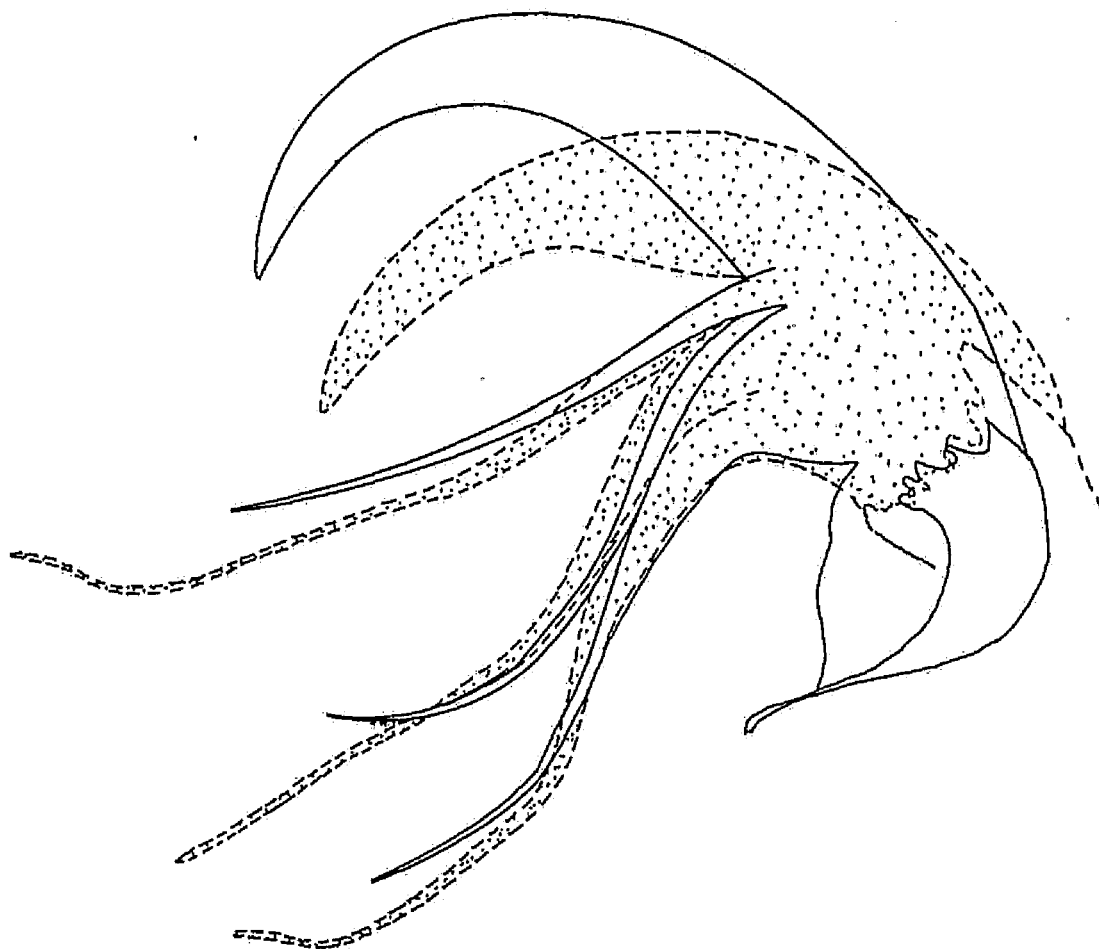
第19図 走査型電子顕微鏡により観察されたCT型 (KgHt) (A) およびPR型 (OyOy2') (B) 個体群の雌成虫の周気管末端部



第20図 CT型およびPR型個体群およびリンゴハダニの雌成虫の周気管末端部の形態比較



第21図 走査型電子顕微鏡により観察されたCT型 (KgHt) (A) およびPR型 (OyOy2') (B) 個体群の雌成虫第1脚先端部



第22図 CT型 (—) およびPR型 (- - - -) 個体群の雌成虫の爪間体の形態比較

2. プレパラート標本による形態比較

材料および方法

供試した個体群は前項と同様の飼育個体群である。メタノール・酢酸混合液で30分間処理した雌成虫を、ホイヤー氏液を用いてスライドガラス上に側面が上になるように封入した。生物顕微鏡により周気管の形態を観察し、爪間体については腹毛と爪間体との角度（第23図-a）ならびに曲率（第23図-b）を測定した。また、胴部背面の最前方に位置する通常毛（P1）と後方の内仙毛（C4）、外仙毛（L4）および臀毛（CL）（第24図；背毛の記号はEhara and Tho (1988) に準じた）の長さについても計測した。なお、ミカンハダニの背毛の多くは歪曲しているが、毛の歪曲率に個体差はほとんど認められなかったため、実用上の便利さから背毛の長さは毛の基部から先端までの直線距離として計測した。

結 果

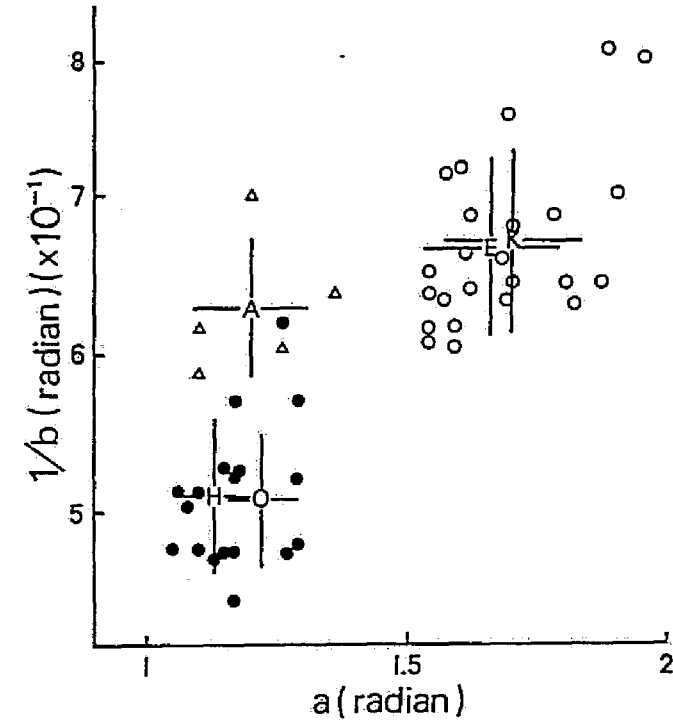
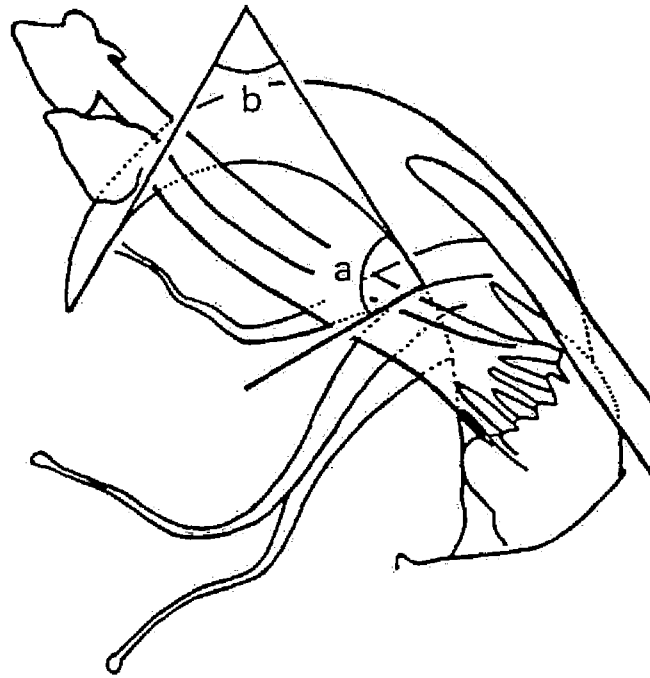
周気管末端部の形態は走査型電子顕微鏡による観察ではエステラーゼアイソザイム型間で僅かな相違がみられたが、生物顕微鏡による観察では標本作成時に周気管の形態が変化し易いため、微小な相違を識別するのは困難であった。

腹毛と爪間体との角度（a）と、爪間体の曲率（b）の角度をラジアンで示すと、aはCT型のKgHtとEhMy1では1.5~2.0であるのに対してPR型のHkSpとOyOy2'では1.0~1.3であり、PR型ではCT型に比べて明らかに小さかった（第23図）。また、曲率bはPR型に比べてCT型の方が明らかに小さく、CT型の爪間体はPR型のものに比べて鋭く曲がっていた。これらの平均値を個体群間で比較すると、角度aおよび曲率bのいずれにおいてもCT型のKgHtおよびEhMy1とPR型のHkSpおよびOyOy2'との間に明瞭な差が認められた（第8表； $p < 0.05$ ）。一方、リンゴハダニのAmKi

第8表 エステラーゼ型の異なるミカンハダニ個体群およびリンゴハダニにおける雌成虫の爪間体（第1脚）の腹毛との角度（a）ならびに曲率（b）

個体群	エステラーゼ型	供試虫数	a ^a	b ^a
KgHt	CT	13	1.70±0.13a	1.50±0.12a
EhMy1	CT	11	1.66±0.13a	1.51±0.11a
HkSp	PR	9	1.13±0.07b	1.97±0.18b
OyOy2'	PR	9	1.22±0.07b	1.98±0.16b
AmKi(P. ulmi)	-	5	1.20±0.11b	1.59±0.10a

^a 第23図参照；平均値（ラジアン）±SD，表中のアルファベットが異なるものはDuncanの多重検定法において有意差が認められた（ $p < 0.05$ ）ことを示す。



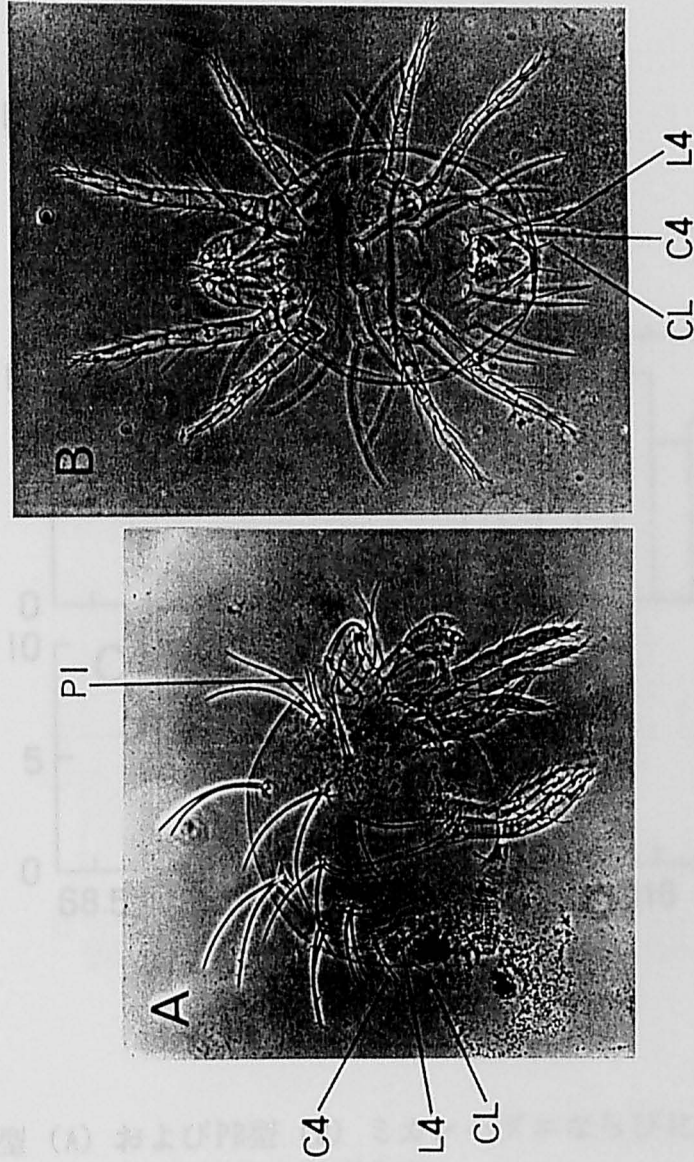
第23図 爪間体と腹毛との角度 (a) ならびに爪間体の曲率 (b) (○, CT型; ●, PR型; △, リンゴハダニ: アルファベットは各個体群の平均値を示し, 縦横の棒はそれぞれ標準偏差を示す. K, KgHt; E, EhMyl; H, HkSp; O, OyOy2'; A, AmKi)

の爪間体では、角度 a はPR型にきわめて類似し、逆に曲率 b はCT型に近かった。したがって、リンゴハダニの爪間体はPR型と同様に腹毛の付近から曲がり始め、腹毛から先端までの曲がり具合はCT型と同様に大きかった（第23図，第8表）。

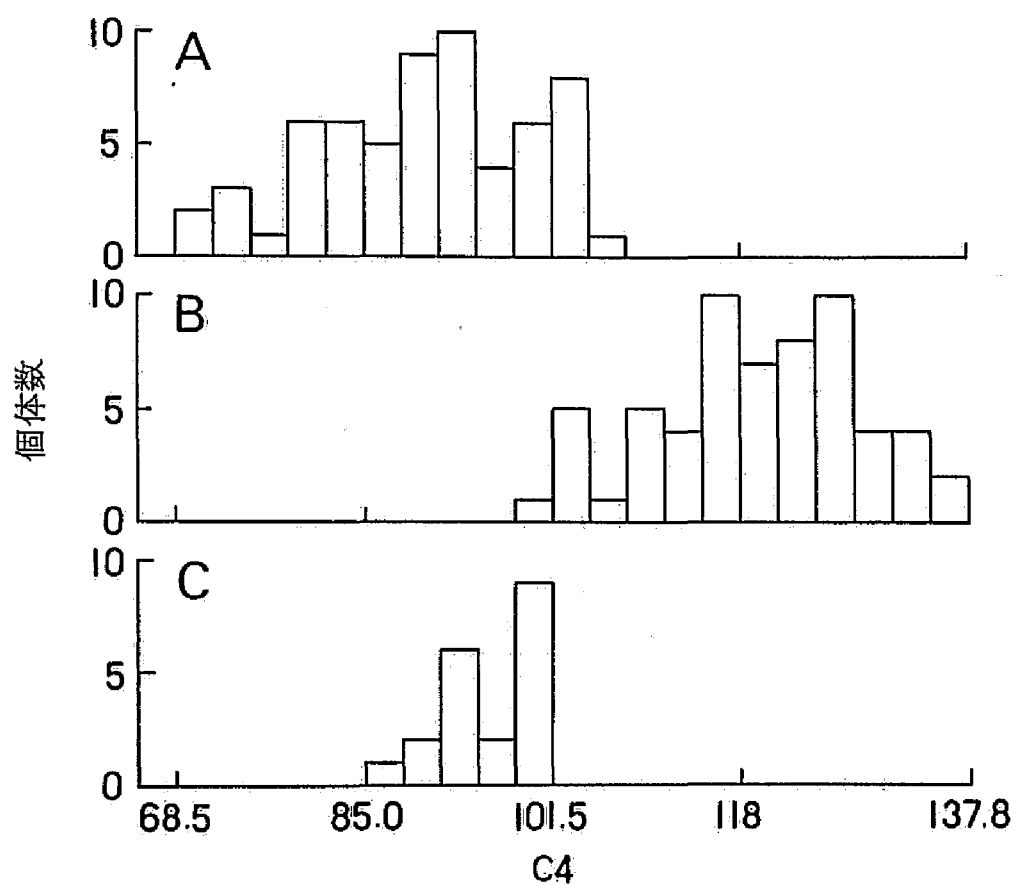
背毛の長さは、いずれもDuncanの多重検定法においてミカンハダニの2型相互の間およびリンゴハダニとの間で有意差が検出され、その場合の有意水準はCT型とリンゴハダニのC4で5%であった他はいずれも1%であった。C4はCT型ミカンハダニとリンゴハダニの間では視覚的には顕著な差はみられなかったが、PR型ではこれらに比べて明らかに長かった（第25図）。L4はCT型，PR型，リンゴハダニの順に短かった（第26図）。また，CL（第27図）およびP1（第28図）はいずれもCT型で他より短く，PR型とリンゴハダニの間では差が小さかった。したがって，C4，L4，CLおよびP1の長さはいずれもPR型の方がCT型に比べて長い傾向があった。これらの中で，L4とCLはCT型とPR型の頻度分布に重なりがみられず明瞭な差があり，逆に分布の重複が最も大きかったのはP1であった。

これら背毛の相対比（第9表）ではL4/C4，CL/C4，P1/L4およびP1/CLでミカンハダニのCT型とPR型の顕著な相違が検出された（ $p < 0.05$ ）。これらに比べて顕著ではないが，L4/CLおよびP1/C4においてもエステラーゼ型間に差異がみられた。また，リンゴハダニのAmKi個体群はこれら全ての相対比において，ミカンハダニの各個体群との間に有意差があった（ $p < 0.05$ ）。

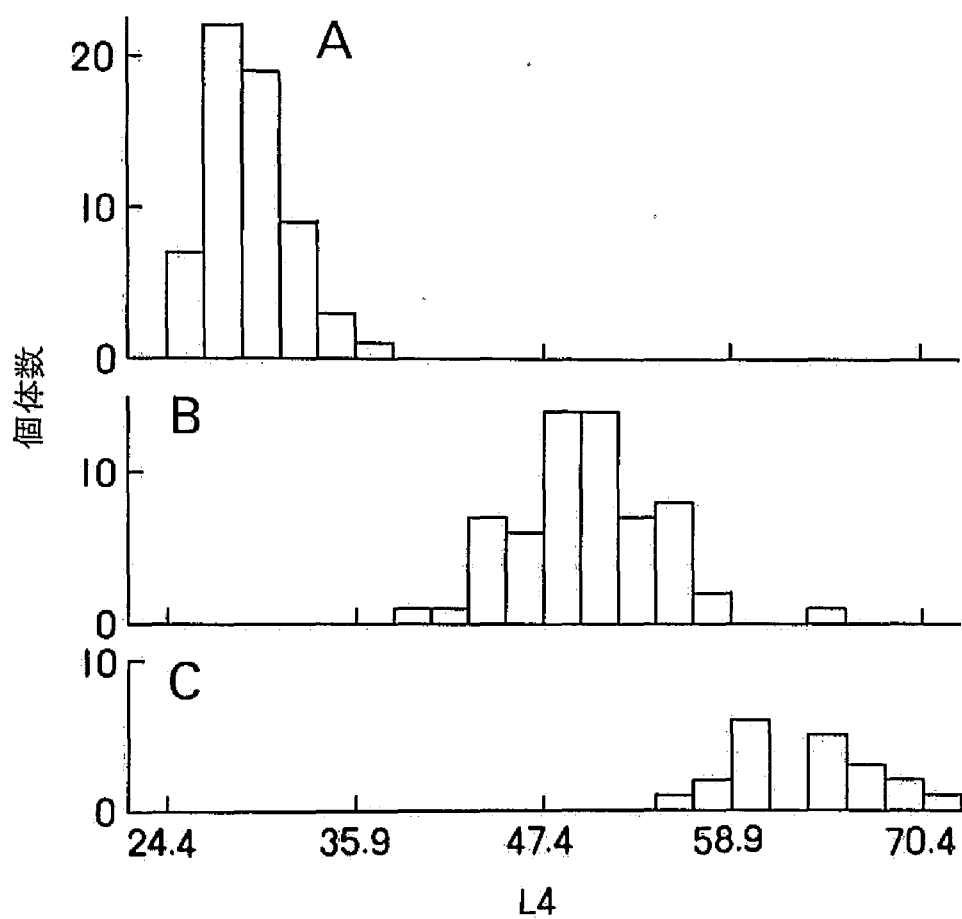
L4/C4およびCL/C4の相対比は真梶（1961a）が示した結果とよく一致し，ミカンハダニのL4/C4はほぼ0.5以下であり，リンゴハダニではほぼ0.6以上であった（第29図）。また，ミカンハダニのCT型個体群のL4/C4は0.25～0.4程度であるのに対して，PR型個体群では0.35～0.5であり，後者がやや大きい傾向がみられた。また，各型における個体群ごとの平均値においても同様の相違がみられた（第9表）。一方，P1/L4ならびにP1/CLではいずれもCT型個体群の方がPR型個体群より顕著に大きく，両型間で分布の重なりはみられなかった（第30図）。また，リンゴハダニはPR型に近い位置に分布した。このように，ミカンハダニのCT型とPR型を区別するためには前述のL4/C4およびCL/C4の相対比よりもP1/L4およびP1/CLの方が適していた。



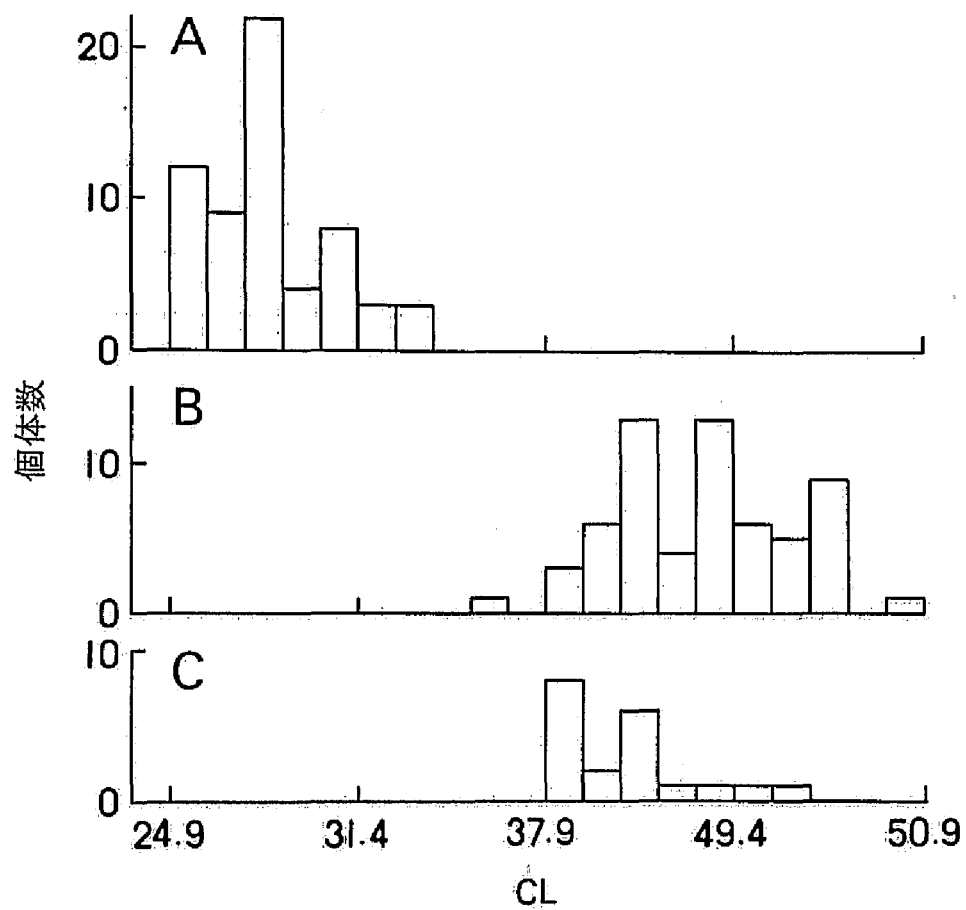
第24図 プレパレート標本により観察されたCT型ミカンハダニ雌成虫
A: 側面, B: 腹面



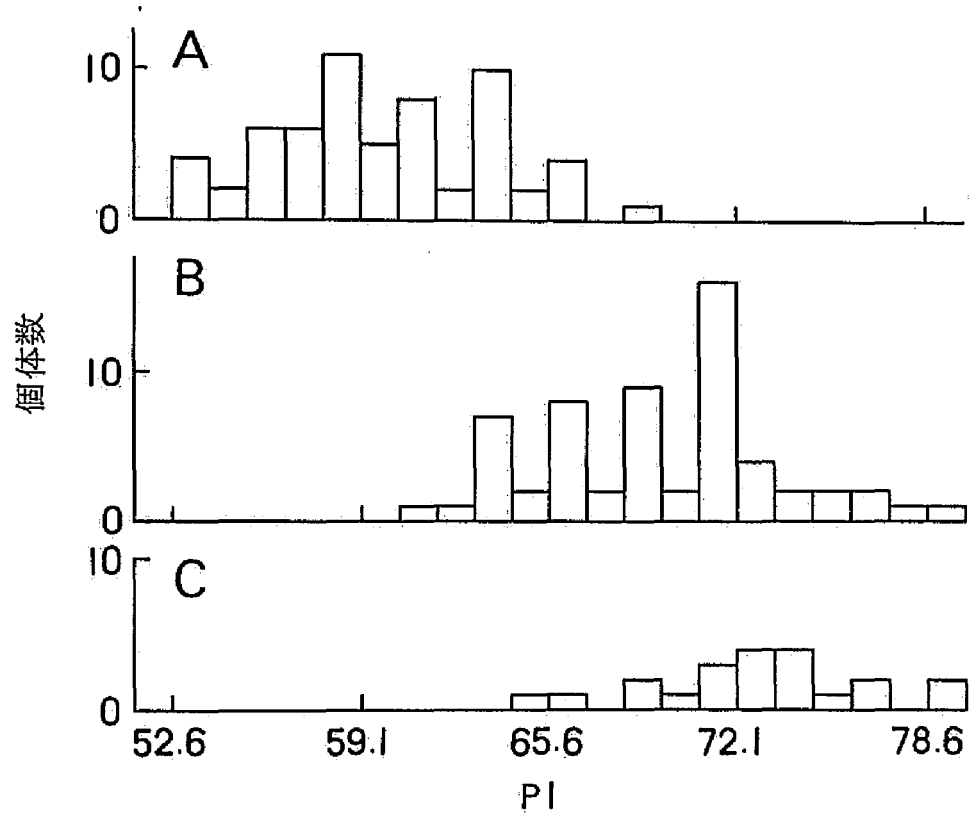
第25図 CT型 (A) およびPR型 (B) ミカンハダニならびにリンゴハダニ (C) 飼育
個体群におけるC4長の頻度分布



第26図 CT型 (A) およびPR型 (B) ミカンハダニならびにリンゴハダニ (C) 飼育
個体群におけるL4長の頻度分布



第27図 CT型 (A) およびPR型 (B) ミカンハダニならびにリンゴハダニ (C) 飼育
個体群におけるCL長の頻度分布



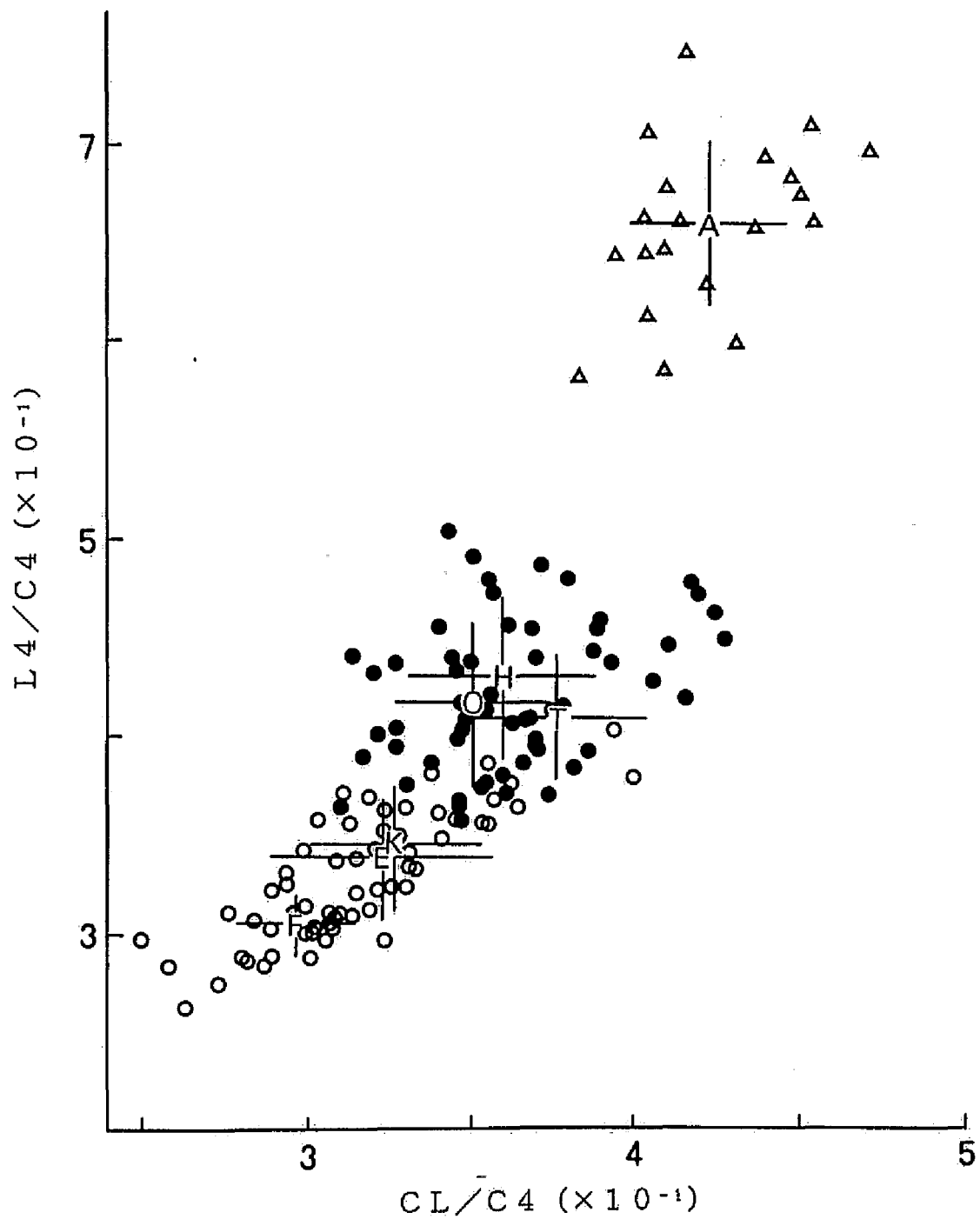
第28図 CT型 (A) およびPR型 (B) ミカンハダニならびにリンゴハダニ (C) 飼育
 個体群におけるPI長の頻度分布

第9表 エステラーゼ型の異なるミカンハダニ個体群およびリンゴハダニの飼育個体群における雌成虫の背毛 (C4, L4, CLおよびP1) の相対比

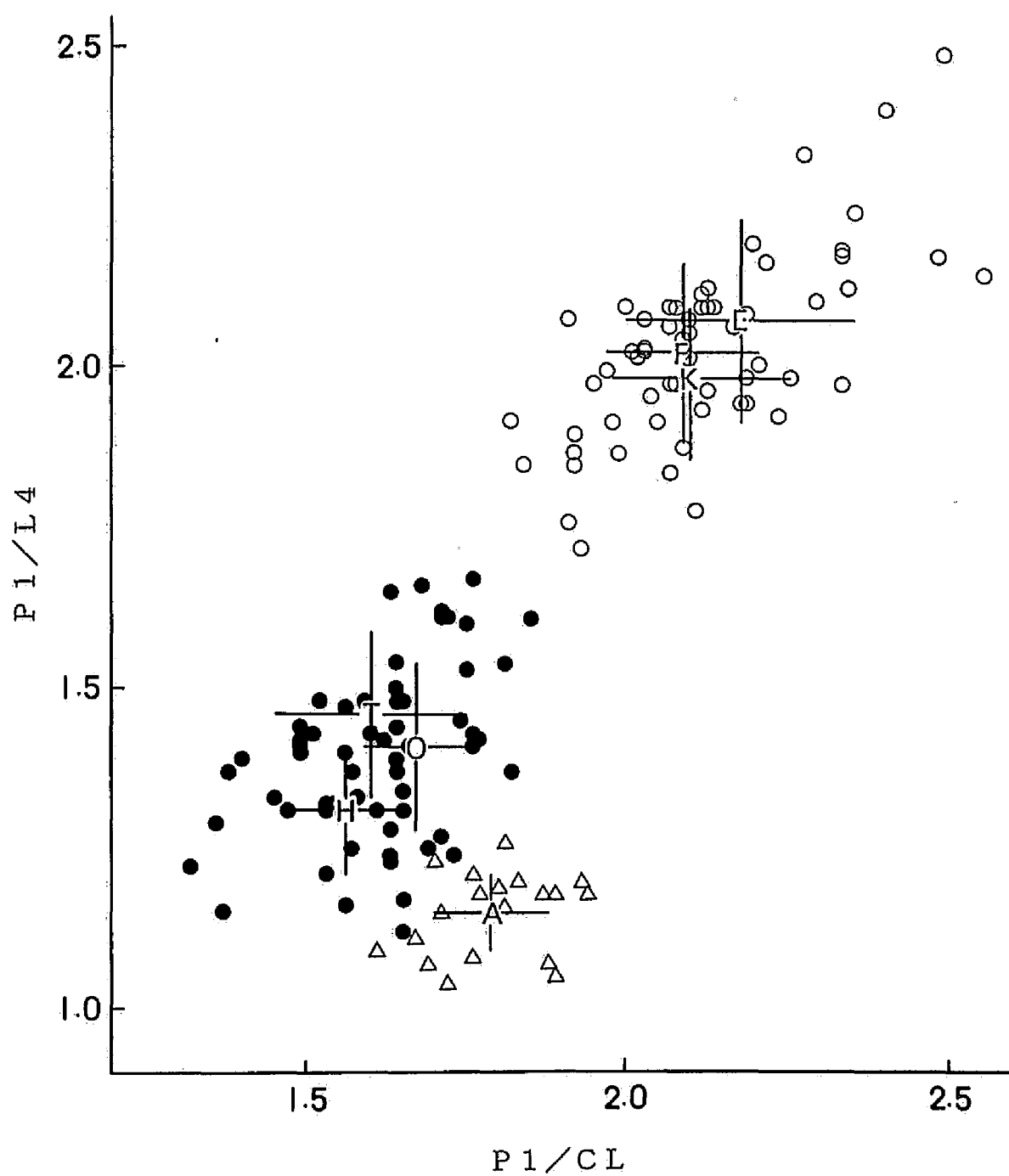
個体群	エステラーゼ型	供試虫数	相対比 (平均値±SD)		
			L4/C4	CL/C4	L4/CL
EhMy1	CT	21	0.34±0.03b	0.32±0.04b	1.05±0.07ab
FoYk	CT	20	0.30±0.02a	0.30±0.02a	1.03±0.05a
KgHt	CT	20	0.34±0.03b	0.33±0.03b	1.05±0.06ab
OyOy2'	PR	20	0.42±0.04c	0.35±0.02c	1.19±0.12c
HkSp	PR	20	0.41±0.03c	0.38±0.03d	1.09±0.07b
TtDe2	PR	20	0.43±0.04c	0.36±0.03c	1.21±0.12c
AmKi(P. ulmi)		20	0.66±0.04d	0.43±0.02e	1.56±0.10d

個体群	相対比 (平均値±SD)		
	P1/L4	P1/CL	P1/C4
EhMy1	2.08±0.16a	2.18±0.18a	0.70±0.04b
FoYk	2.03±0.14ab	2.09±0.12b	0.62±0.05c
KgHt	2.00±0.13b	2.10±0.16b	0.68±0.05b
OyOy2'	1.41±0.13c	1.67±0.08d	0.58±0.04de
HkSp	1.46±0.13c	1.60±0.15de	0.61±0.05cd
TtDe2	1.31±0.10d	1.57±0.10e	0.56±0.04e
AmKi	1.15±0.07e	1.79±0.09c	0.76±0.04a

表中のアルファベットが異なるものはDuncanの多重検定法において有意差が認められた ($p < 0.05$) ことを示す。



第29図 飼育個体群のC4に対するL4およびCLの長さの相対比 (○, CT型; ●, PR型; △, リンゴハダニ: アルファベットは各個体群の平均値を示し, 縦横の棒はそれぞれ標準偏差を示す. K, KglIt; E, EhMyl; F, FoYk; H, HkSp; T, TtDe2; O, OyOy2'; A, AmKi)



第30図 飼育個体群のS2およびCに対するP1の長さの相対比 (○, CT型; ●, PR型; △, リンゴハダニ: アルファベットは各個体群の平均値を示し, 縦横の棒はそれぞれ標準偏差を示す. K, KgHt; E, EhMyl; F, FoYk; H, HkSp; T, TtDe2; O, OyOy2'; A, AmKi)

3. 地域個体群のエステラーゼ型と形態的変異

第5章-1および2ではミカンハダニのCT型とPR型間の形態的相違について飼育個体群を用いて調査した結果を示した。この中で、爪間体の形状ならびに背毛の長さの比において両者の形態的差異が示された。そこで、本項では野外で採集したミカンハダニの雌成虫について形態を調査した。しかし、爪間体については計測に困難があり、多数の標本を扱うことはできないため、調査は背毛の長さについて行った。

材料および方法

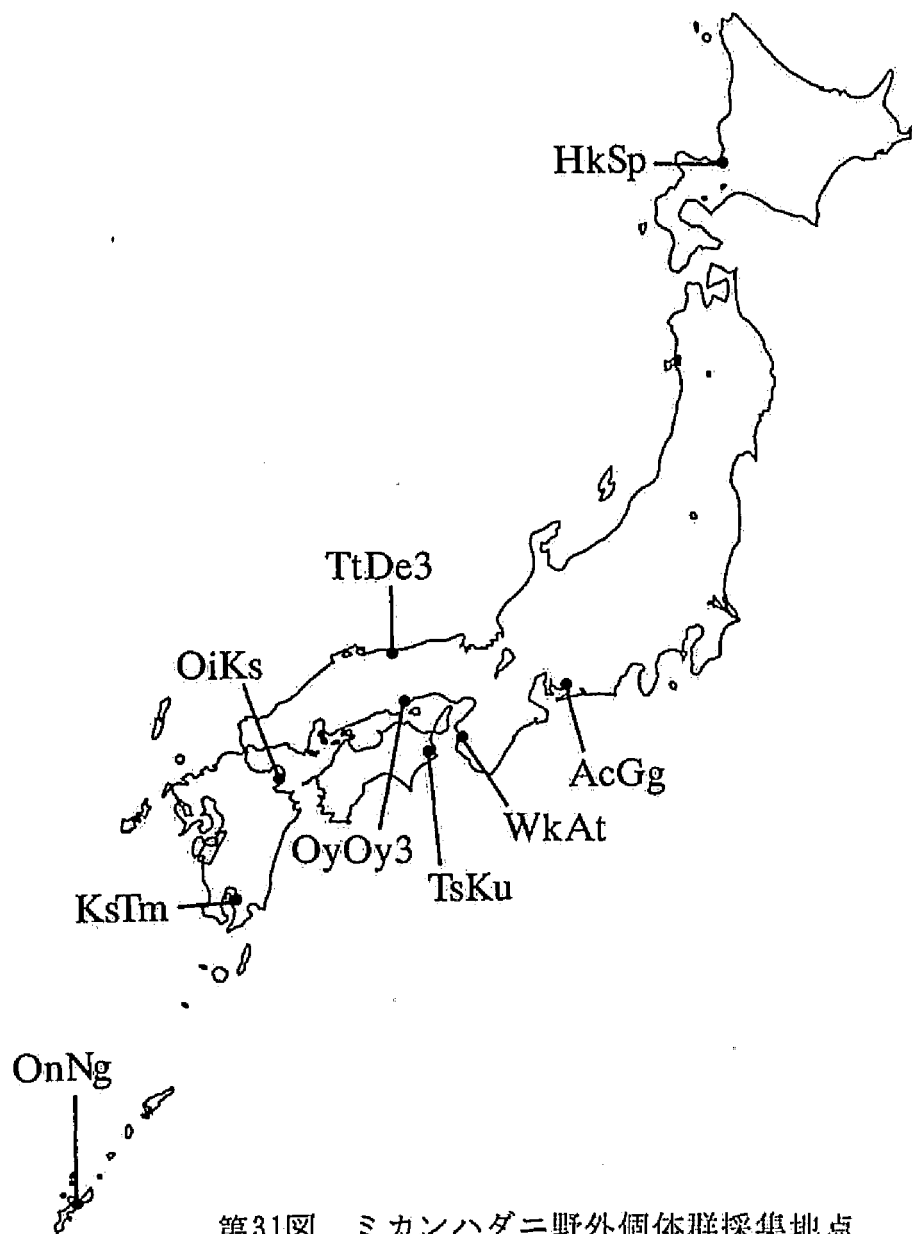
野外のウンシュウミカン、ナシおよびクワから採集したミカンハダニ雌成虫（計9個体群；第31図）を前項と同様にプレパレート標本にし、C4, L4, CLおよびP1の長さを計測した。なお、調査した個体群の中でAcGg, WkAt, TsKu, OiKs, KsTmおよびOnNgの6個体群はCT型で、HkSp, OyOy3およびTtDe3の3個体群はPR型である。

次に、飼育個体群も含めて、調査した各個体の4本の背毛について算出した全ての相対比（L4/C4, CL/C4, P1/C4, P1/L4, P1/CLおよびL4/CL）の個体群毎の平均値をもとにクラスター分析を行った。なお、非類似度には標準化ユークリッド平方距離を用い、クラスターの結合は群平均法により行った。

結 果

背毛長の相対比は、野外の個体群（第10表）においても飼育個体群（第9表）と同様の傾向を示した。しかし、個体群間の差異は飼育個体群の場合に比べて小さく、エステラーゼ型が異なる全ての個体群間で顕著な相違が検出されたのはP1/L4およびP1/CLだけであった。

野外個体群のP1/L4とP1/CLの散布図（第32図）では、飼育個体群の場合に比べてエステラーゼ型間の相違は明瞭ではなく、両者の分布に重なりがみられた。この原因は、CT型飼育個体群のP1/S2とP1/Cはそれぞれ1.7~2.5および1.8~2.6の間に分布している（第30図）のに対して、CT型野外個体群ではそれぞれ1.4~2.2および1.6~2.4となり、比率が低下しているためである。しかし、これら相対比の関係は飼育個体群の場合と同様の傾向を示した。



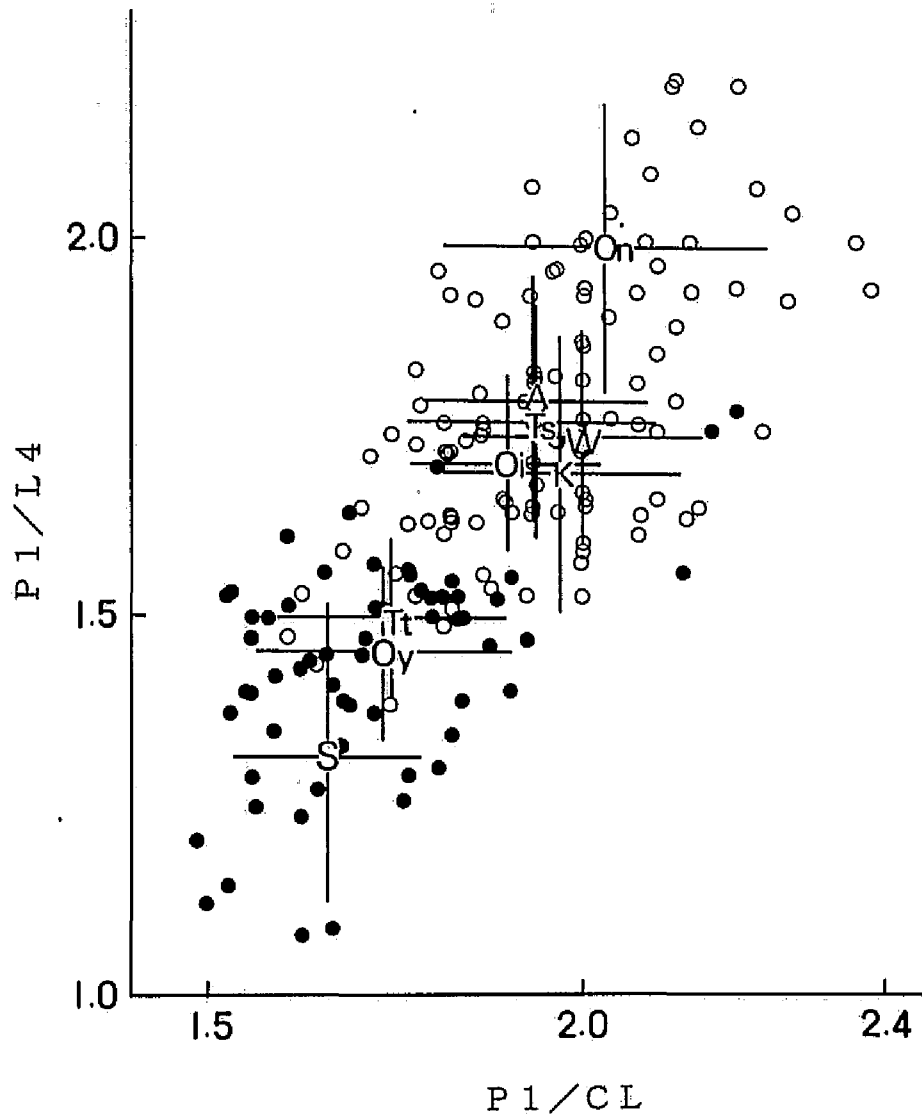
第31図 ミカンハダニ野外個体群採集地点

第10表 エステラーゼ型の異なるミカンハダニ個体群およびリンゴハダニの野外
個体群における雌成虫の背毛 (C4, L4, CLおよびP1) の相対比

個体群	エステラ ーゼ型	供試 虫数	相対比 (平均値±SD)		
			L4/C4	CL/C4	L4/CL
OnNg	CT	22	0.35±0.03a	0.34±0.03bcd	1.02±0.06a
WkAt	CT	20	0.39±0.03bc	0.34±0.03bcd	1.15±0.08bcd
TsKu	CT	19	0.37±0.04ab	0.34±0.04bc	1.10±0.08b
KsTm	CT	20	0.36±0.03ab	0.31±0.03a	1.17±0.11cd
AcGg	CT	15	0.36±0.04a	0.33±0.03ab	1.09±0.08b
OiKs	CT	16	0.36±0.03ab	0.32±0.02ab	1.12±0.07bc
OyOy3	PR	24	0.42±0.03c	0.36±0.02d	1.20±0.10d
TtDe3	PR	25	0.39±0.09b	0.35±0.03cd	1.17±0.09cd
HkSp	PR	14	0.42±0.05c	0.33±0.02abc	1.28±0.15e

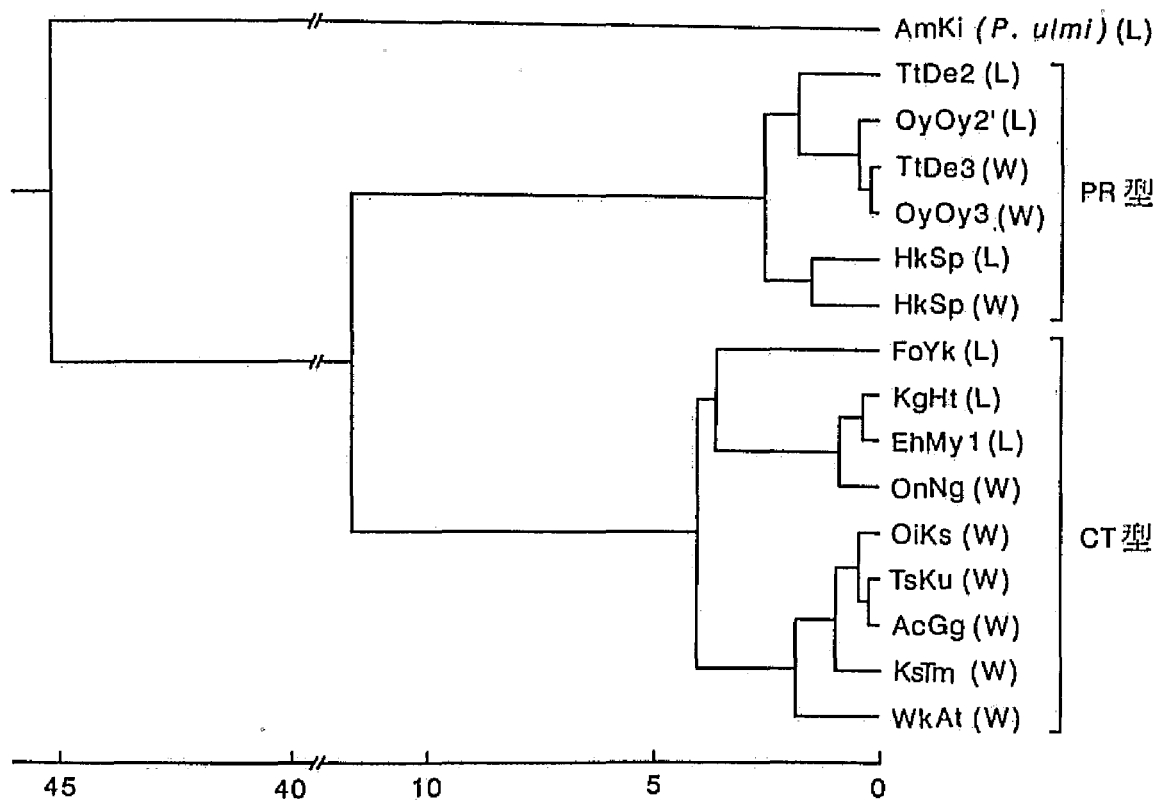
個体群	相対比 (平均値±SD)		
	P1/L4	P1/CL	P1/C4
OnNg	1.99±0.19a	2.03±0.22a	0.69±0.05a
WkAt	1.71±0.21b	2.00±0.16ab	0.68±0.05a
TsKu	1.76±0.16b	1.93±0.17ab	0.65±0.04b
KsTm	1.69±0.19b	1.97±0.16ab	0.61±0.05bc
AcGg	1.79±0.16b	1.93±0.15ab	0.63±0.05bc
OiKs	1.70±0.12b	1.90±0.13b	0.61±0.05bc
OyOy3	1.45±0.11c	1.73±0.17c	0.61±0.04bc
TtDe3	1.50±0.10c	1.75±0.15c	0.61±0.05c
HkSp	1.32±0.19d	1.66±0.13c	0.55±0.05d

表中のアルファベットが異なるものはDuncanの多重検定法において有意差が認められた ($p < 0.05$) ことを示す。



第32図 野外個体群のL4およびCLに対するP1の長さの相対比 (○, CT型; ●, PR型: アルファベットは各個体群の平均値を示し, 縦横の棒はそれぞれ標準偏差を示す. On, OnNg; Oi, OiKs; Ts, TsKu; A, AcGg; K, KsTm; W, WkAt; Tt, TtDe3; Oy, OyOy3; S, HkSp)

野外個体群と飼育個体群の背毛の全ての相対比（第9および10表）を基に作成したクラスター（第33図）は、最初にミカンハダニとリンゴハダニの2群に大きく分かれ、次いでミカンハダニのCT型とPR型が分かれた。また、エステラーゼ型内の個体群間の非類似度は2型間および種間に比べてきわめて小さかった。同じエステラーゼ型の個体群の非類似度と地理的分布との間には明瞭な関係はみられなかったが、北海道産のHkSpと他のPR型個体群との間に違いがみられた。また、沖縄産の野外個体群OnNgは他の野外個体群とは異なり、むしろ飼育個体群との類似性が高かった。



第33図 飼育および野外個体群のC4, L4, CLおよびP1の長さの相対比によるクラスター分析

4. ま と め

本章で観察したミカンハダニCT型個体群とリンゴハダニの周気管ならびにCT型個体群の爪間体の形態はMcGregor and Newcomer (1928) がリンゴハダニとミカンハダニについて示した形態的特性とほぼ一致する。しかし、PR型ミカンハダニの周気管末端はCT型とリンゴハダニの中間的な形状を呈しており、爪間体でもエステラーゼ型間で顕著な相違がみられ、リンゴハダニが両者の中間的形状を有することが明らかになった。爪間体の構造はハダニ亜科の属への検索に用いられている（江原，1975c）重要な形質である。したがって、ミカンハダニのCT型とPR型の個体群間において爪間体に明瞭な相違がみられた点は、今後これらの系統関係を検討する上で興味深い。また、爪間体の形状はハダニの歩行機能に直接関与する形質でもあることから、これらの相違はCT型およびPR型個体群の行動・生態を比較する上でも重要な情報になると考えられる。

CT型の野外個体群と室内個体群の間でP1/L4とP1/CLの比率に若干のずれがみられた原因は不明であるが、いずれも傾向は同じであり、両エステラーゼ型の形態的差異が明らかになった。従来、ミカンハダニとリンゴハダニを識別する形態上の基準として、内仙毛（C4）、外仙毛（L4）および臀毛（CL）の相対比が用いられている（Pritchard and Baker, 1955; 真梶, 1961a; 江原, 1975c）。この方法ではCT型とPR型のいずれもリンゴハダニと明瞭に識別されるため、形態的特性はこれら3者の中ではリンゴハダニが最も類縁関係の薄いものと考えられてきた。しかし、P1に対するL4およびCLの比率を用いることにより、これらの関係は変化し、PR型ミカンハダニはCT型とリンゴハダニの中間的もしくはむしろリンゴハダニに近い形態的特性を持っている印象を受ける。

個別の形質において必ずしも明確でなかったミカンハダニのCT型およびPR型とリンゴハダニとの関係を、複数の形質を用いてクラスター分析によって検討した結果、リンゴハダニ、ミカンハダニのCT型およびPR型個体群の3つの大きなクラスターが形成された。形質の選択方法によってはこの3つのクラスターの結合順序が変わる可能性も否定できないが、少なくともこれら3つの群が明確に区別されることは明らかである。今後、遺伝学的な手法も用いてこれらエステラーゼ型の異なるミカンハダニおよびリンゴハダニの系統関係を調査する必要がある。

第6章 変異集団の分化の要因

第4章ではエステラーゼ型によりミカンハダニの休眠性と寄生性が識別できることを示した。すなわち、エステラーゼ型がCT型の個体群は非休眠系統でカンキツ寄生型であり、PR型の個体群は休眠系統でナシ寄生型である。緒言でも述べたように、ミカンハダニの種内に休眠性の異なる2系統が存在することはすでに示唆されていた（真梶，1961b；内田，1982；森本・高藤，1983）ものの、それらを明確に識別し得る指標がなかったため、それぞれの系統内における遺伝的分化や生態的特性の変異はあまり調査されていない。

本章ではこれら系統間にみられるような分化が生じる要因を解明する目的で、同じエステラーゼ型を有する個体群間における遺伝的分化ならびにエステラーゼ型間における寄生性の変異の要因について検討した。

1. 個体群間の遺伝的分化

a. CT型個体群におけるエステラーゼアイソザイム遺伝子頻度の地理的変異

CT型個体群内ではアガロースゲルおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動法においてエステラーゼアイソザイムの個体変異が検出され、中でもポリアクリルアミドゲル電気泳動法に検出される α -Est1 では顕著な多型性がみられる（第4章-2-a, 第12図）。Ward et al. (1982) は *Tetranychus* 属の3種のハダニについてリンゴ酸脱水素酵素（MDH）の遺伝子頻度を調査した際に、雄成虫の電気泳動パターンは検出できなかったとしている。また、ハダニ類のエステラーゼに関するこれまでの調査（Blank, 1979; Sula and Weyda, 1983; Weyda et al., 1984; Kuwahara et al., 1981; 桑原, 1982, 1984b; Kuwahara, 1984）においてもいずれも遺伝子分析をするには至っていない。本項では、 α -Est1 について遺伝子分析を行い、その結果に基づいて地域個体群間の対立遺伝子頻度を調査した。

1). α -Est1 遺伝子分析

材料および方法

供試虫はKgHt, EhMy1およびFoYkの3個体群である。

母-息子系：各個体群の飼育集団中から第3静止期の雌を採取し、寒天ゲル上においたクワ葉片（2×2 cm）に個体ごとに移して隔離飼育した。雌成虫が脱皮した後、3～4日間産卵させ、雌成虫を個体ごとに管瓶に移して冷凍保存（-20

℃)した。産下された卵は成虫(雄)に發育するまでそのまま飼育を続けた。發育した雄は葉片ごとにまとめて管瓶に移し、親の雌成虫とともに冷凍保存した。

母一娘系：母一息子系の場合と同様に第3静止期の雌を隔離し、雌成虫が脱皮した後、各葉片に集団飼育中の個体群から雄成虫を1個体ずつ導入した。3~4日間産卵させた後、各葉片上の雌雄をそれぞれ管瓶に移し冷凍保存した。産下された卵は成虫に發育するまでそのまま飼育を続けた。發育した個体の中から雌成虫(F₁)だけを選び、葉片ごとにまとめて管瓶に移して冷凍保存した。

冷凍保存した雌成虫は個体毎に10 μ lのトリス-塩酸緩衝液中ですりつぶして選心ろ過した。泳動の際にはろ液をそれぞれ5 μ lずつサンプルとして用いた。雄成虫は5 μ lの緩衝液中ですりつぶし、そのまま全量をサンプルとして用いた。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は第4章-2-aと同様である。

結 果

母一息子系：雌成虫Pf1, Pf2およびPf3の α -Est1ではそれぞれ1本のメインバンド(図中の矢印)が検出され、Pf1の泳動帯の易動度は他の2個体に比べて小さかった(第34図)。また、これらの子孫(Fm1, Fm2およびFm3)では母親のメインバンドと同じ位置に泳動帯が検出された。これに対して、Pf4ではこれら2本の泳動帯がともに検出され、さらにその中央にも泳動帯が一本検出された。Pf4の子孫(Fm4)では易動度の大きい泳動帯または小さい泳動帯のいずれか一方が検出され、個体によって分離パターンが2種類に分かれた。そこで、検出されたバンドを易動度の大きい順にF, IおよびSとし、FバンドまたはSバンドが1本だけ検出されたものをそれぞれf型およびs型の分離パターン、3本のバンドがすべてみられたものをi型の分離パターンとして、実験に用いた全ての雌成虫の分離パタ

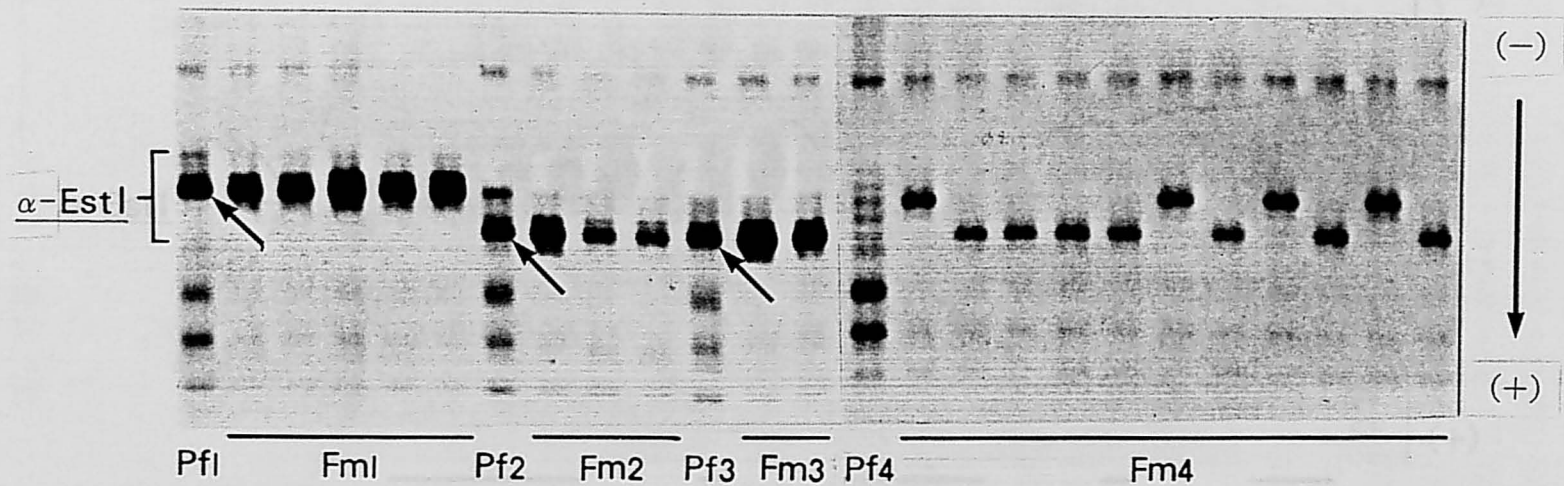
第11表 α -Est1における親雌のバンド型と次世代雄成虫のバンド型頻度との関係

親雌の バンド型 ^a	親雌の 個体数	次世代 雄成虫数	次世代雄成虫のバンド型頻度 ^b		
			f	i	s
f	9	37	1.00	0	0
i	10	42	0.67	0	0.33*
s	4	19	0	0	1.00

^a fおよびs, それぞれFおよびSバンドだけを有するもの;

i, F, IおよびSの3本のバンドを有するもの

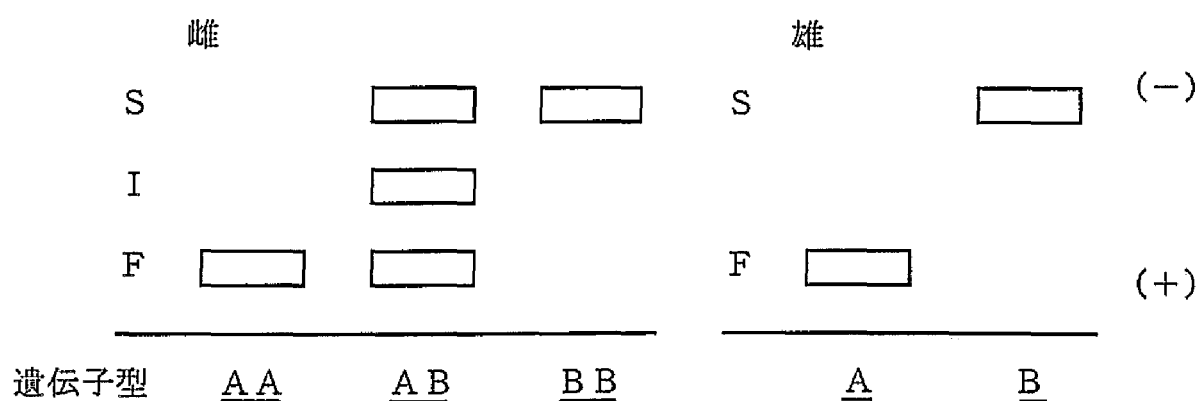
^b *, χ^2 検定によりfの頻度との間に有意差($p < 0.05$)が認められる



第34図 親雌 (Pf) およびその息子 (Fm) のエステラーゼ泳動像 (記号の後の数字が同じものは親子であることを示す。図中の矢印はメインバンドを示す)

ーンとそれらが産下した卵から発育した雄の分離パターンの頻度を比較した（第11表）。この結果、f型およびs型の雌からはすべて親と同じ分離パターンの雄が得られたのに対して、i型の雌が産んだ雄の分離パターンはf型とs型に分かれ、i型は検出されなかった。したがって、f型（Pf2およびPf3）およびs型（Pf1）の雌では対立遺伝子がホモになっており、バンドが3本検出された個体（Pf4）ではヘテロであると考えられる。また、これらのことから α -Est1 の分離パターンは2分子の結合体により活性を示すダイマー酵素によるものと推定された。なお、この場合 i 型雌が産んだ雄の子孫の比率は理論的には f 型：s 型で 1：1 であるが、本実験の結果では期待値に適合しなかった（ $p < 0.05$ ）。この原因については不明であり、今後検討する必要がある。

母-娘系：交配実験の結果（第35図）では、f 型 × s 型（Pf5 × Pm5, Pf6 × Pm6）および s 型 × f 型（Pf7 × Pm7, Pf8 × Pm8 および Pf9 × Pm9）の正逆交配により得られた F_1 雌の分離パターン（Ff5, Ff6, Ff7, Ff8 および Ff9）はすべて i 型であった。このことから、 α -Est1 は 2 対立遺伝子を有する単一の遺伝子座に支配されていることが証明された。したがって、以後は便宜上 α -Est1 を遺伝子座名とし、F および S 泳動帯に対応する対立遺伝子をそれぞれ A および B とする（第36図）。



第36図 α -Est1 のザイモグラムと遺伝子型

2). α -Est1対立遺伝子頻度の個体群間差異

材料および方法

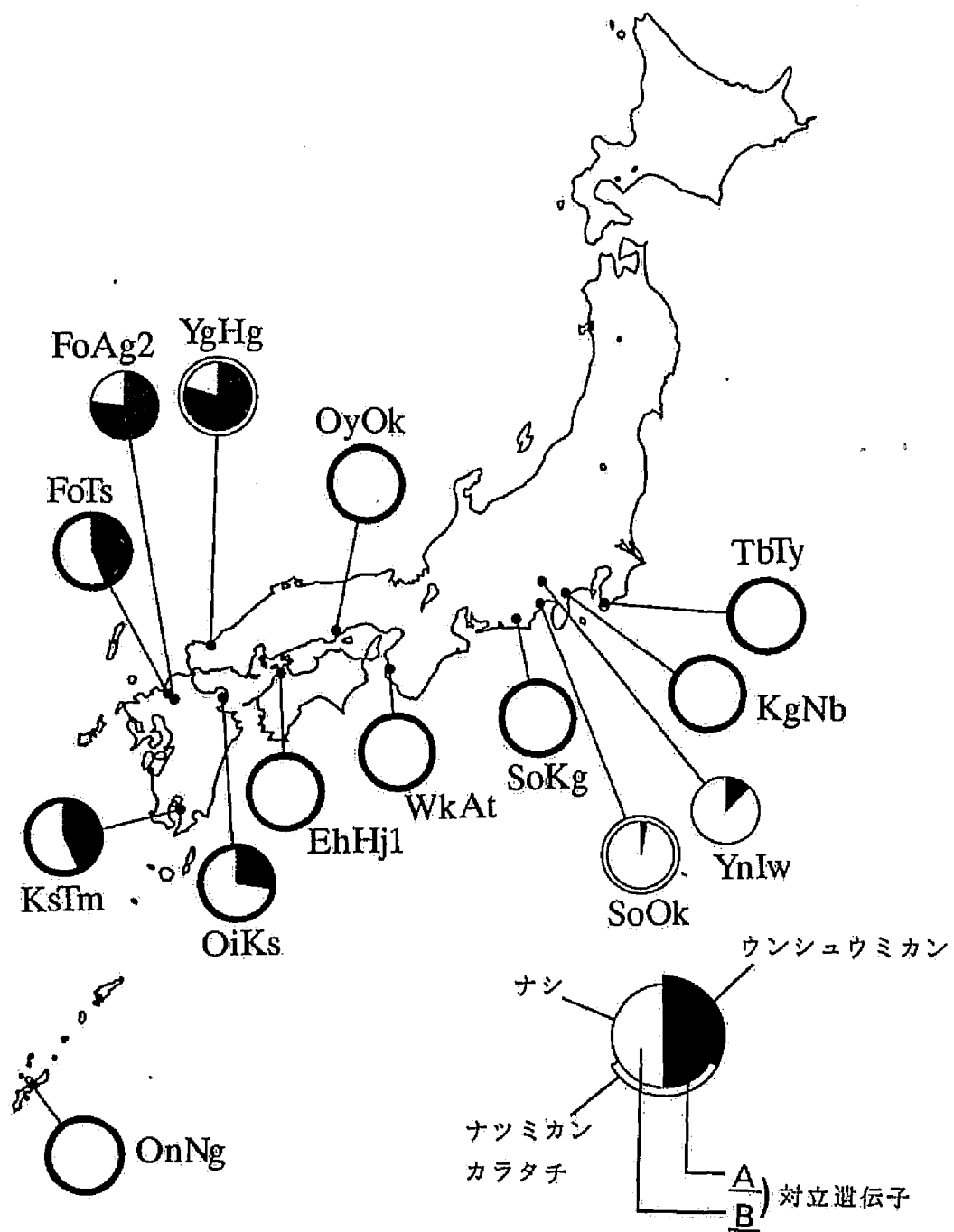
カンキツ園を中心に、千葉県から沖縄県にかけてCT型ミカンハダニを14個体群採集し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により雌成虫の α -Est1における対立遺伝子AおよびBの頻度を調査した。採集した雌成虫は実験に用いるまでの間、冷凍庫（-80℃）に保存した。

結 果

ウンシュウミカン園から採集した10個体群の内、関東、東海、近畿、中国、四国地方および沖縄本島から採集された7個体群では、 α -Est1の対立遺伝子がBに固定していた（第37図）。これに対して、九州地方のウンシュウミカン園から採集された3個体群ではA対立遺伝子が30～45%の頻度で出現し、遺伝子頻度の地理的変異がみられた。

一方、カラタチおよびナシから採集した個体群では、東海地方のものからもA対立遺伝子が低い頻度で出現した。また、山口県のナツミカンと福岡県のナシでのA対立遺伝子の出現頻度はほぼ80%と高かった。このため、これらの樹種においても、 α -Est1の対立遺伝子頻度における地理的傾向はウンシュウミカンの場合と同様と考えられた。

両対立遺伝子が出現した個体群の中で、YnIwとSoOkの2個体群の遺伝子型頻度は χ^2 検定においてハーディー・ワインベルグの法則から推定される期待値との間に有意差（ $p < 0.01$ ）がみられたが、他の5個体群では期待値とほぼ一致した（第12表）。



第37図 CT型ミカンハダニにおける α -Est1対立遺伝子頻度の地理的分布

第12表 CT型地域個体群における α -Est1 の対立遺伝子頻度

個体群	寄主 ^a 植物	雌成 虫数	遺伝子型頻度 ^b			遺伝子頻度		期 待 値 ^c		
			<u>AA</u>	<u>AB</u>	<u>BB</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>AA</u>	<u>AB</u>	<u>BB</u>
<東海地方>										
YnIw	△	114	0.05	0.13	0.82*	0.12	0.88	0.01	0.21	0.77
SoOk	○	96	0.01	0.01	0.98*	0.02	0.98	0.001	0.04	0.96
<九州地方>										
YgHg	○	91	0.64	0.30	0.07	0.79	0.21	0.62	0.33	0.05
OiKs	◎	90	0.08	0.39	0.53	0.27	0.73	0.07	0.40	0.53
FoAg2	△	73	0.57	0.40	0.03	0.77	0.23	0.59	0.36	0.05
FoTs	◎	86	0.16	0.56	0.28	0.44	0.56	0.19	0.49	0.31
KsTm	◎	129	0.19	0.48	0.33	0.43	0.57	0.18	0.49	0.32

^a ◎ ウンシュウミカン, ○ カラタチおよびナツミカン, △ ナシ

^b *: ハーディ・ワインベルグの法則による期待値との χ^2 検定において有意差が認められる ($p < 0.01$).

^c ハーディ・ワインベルグの法則による期待値

3). ま と め

CT型ミカンハダニの α -Est1 は、ポリアクリルアミドゲルの薄層を用いた電気泳動法により、雄成虫 1 個体からでも十分に分離パターンが検出されたため、交配実験に基づいた遺伝子分析ができた。特に、エステラーゼのように複数の遺伝子座が関与し、また修飾され易い酵素を用いる場合には遺伝子分析により遺伝子座を決定する必要がある。したがって、 α -Est1 の遺伝子分析はハダニ類における実験手法の基礎になると考えられる。

武久・田中 (1967) は中国、四国および九州地方から採集したミカンハダニ (CT型) について、薄層寒天電気泳動法によりエステラーゼ泳動帯を検出し、九州地方 (福岡および鹿児島県) と中国地方 (山口県) の個体群の分離パターンは I または III 型で、四国地方 (松山市) の個体群は II 型 (第 3 章-1 参照) であった。本研究でも、アガロース電気泳動法による CT 型ミカンハダニのエステラーゼ分離パターンは I ~ III の 3 つの型に分類された。この中で、FoYk と EhMy1 の分離パターンはそれぞれ I および II 型であり (第 2 図), これらの α -Est1 対立遺伝子は、FoYk と EhMy1 ではそれぞれ A と B に固定している (第 12 および 13 図)。このことから、 α -Est1 はアガロース電気泳動法における E₁ および E₂ 泳動帯を支配している可能性が大きい。また、KgHt は III 型を示す個体群である (第 2 図) が、 α -Est1 対立遺伝子には A と B が混在し、ホモ個体とヘテロ個体がみられる (第 12 図)。この点は、KgHt のエステラーゼ活性とアガロース電気泳動法による検出感度から説明

できる。KgHtで検出されるFまたはSバンドの活性はFoYkやEhMyIのものに比べて低く、一方泳動帯の検出感度はポリアクリルアミドゲルに比べてアガロースゲルでは低いため、アガロースゲル電気泳動法におけるⅢ型は、ⅠまたはⅡ型の中でE₁またはE₂泳動帯の活性が低い個体によるものと考えられる。

α-Est1対立遺伝子の地理的分布の傾向は武久・田中（1967）の調査結果とほぼ一致し、A対立遺伝子は九州地方に多く分布している。したがって、このような分布の偏りは1960年代には既に生じていたものと考えられる。武久・田中（1967）はE₁およびE₂泳動帯は有機リン剤抵抗性を示す指標であるとし、田中ら（1972）も交配実験の結果からCMP剤抵抗性遺伝子がE₁エステラーゼ活性を支配している可能性が大きいことを指摘した。エステラーゼ活性と昆虫の薬剤抵抗性との関係についてOppenoorth and van Asperen（1960）は有機リン剤抵抗性イエバエMusca domestica L.の研究から、'抵抗性系統ではアリエステラーゼ活性を支配する遺伝子が突然変異により対立遺伝子に変化し、その結果有機リン剤を解毒する酵素が生産される'という主旨の"mutant aliesterase説"を提唱した。これに対して、Smislaert（1965）は速度論的研究から、ナミハダニの有機リン剤抵抗性機構はOppenoorth and van Asperen（1960）の仮説では説明できないとし、その後はアセチルコリンエステラーゼを対象とした研究を展開した（Smislaert et al., 1970）。その後、マラチオン抵抗性イエバエにおいてもカルボキシルエステラーゼ活性が非常に高いにもかかわらず、アリエステラーゼ活性は感受性系統と変わらない系統が発見され、アリエステラーゼ活性と薬剤抵抗性との関係に対する関心は薄らいできた（本山, 1981）。一方、ツマグロヨコバイNephotettix cincticeps Uhler（Miyata and Saito, 1976; 宮田ら, 1981）やヒメトビウンカLaodelphax striatellus Fallen（Miyata et al., 1976）、ネッタイエカCulex pipiens quinquefasciatus（Miyata et al., 1984）などの昆虫やカンザワハダニ（Kuwahara et al., 1981; Kuwahara, 1984; 桑原, 1984b）では電気泳動法により分離されるエステラーゼの中にマラチオン分解活性を示すものがあることが実証されている。またモモアカアブラムシMyzus persicae（Sulz.）では有機リン剤抵抗性とエステラーゼ活性との関係が示されており（Devonshire, 1977; Devonshire and Sawicki, 1979）、最近ではワタアブラムシAphis gossypii Gloverではエステラーゼ活性の異なる個体群の存在が知られており（Hama and Hosoda, 1988; 西東, 1989）、これらの活性の相違と薬剤抵抗性との関連を示す報告もみられる（井上, 1987; Takada and Murakami, 1988）。

ミカンハダニのエステラーゼ泳動帯に関しては有機リン剤等に対する分解活性が調査されていない。しかし、前述のカンザワハダニや昆虫類で薬剤分解活性がみられる場合があることから、ミカンハダニの場合にもエステラーゼアイソザイ

ムと薬剤抵抗性との関係は否定できない。さらに、 α -Est1は武久・田中（1967）および田中ら（1972）が薬剤抵抗性との関連を示したE₁およびE₂泳動帯に対応していることから、殺虫剤および殺ダニ剤の散布がこの対立遺伝子にみられる地理的分布の偏りを生じた一因である可能性が考えられる。特にカンキツ園ではミカンハダニの薬剤抵抗性がきわめて深刻な問題であり（井上，1989），薬剤散布がハダニ類の遺伝的形質に及ぼす影響についての研究は、今後さらに必要である。

また、ハダニ類では近親交配が頻繁に行われ易いと考えられている。近親交配が行われる場合には、集団内のホモ接合体の比率が高まり、遺伝子型頻度はハーディー・ワインベルグの法則から外れる。しかし、 α -Est1にAとBの両対立遺伝子がみられる個体群の遺伝子型頻度は、この法則から推定される期待値とほぼ一致し、東海地方における2例を除いて有意差はみられなかった。Ward et al.（1982）が調査したナミハダニと *Tetranychus turkestan*i (Ugarov and Nikolski) のリンゴ酸脱水素酵素でも、検出された遺伝子型頻度がハーディー・ワインベルグの法則に従うことを示した。さらに彼らはヘテロ接合体率から求めた近交係数は、調査された5つの個体群でいずれも0に近いことを示した。分子レベルでみたこれらの遺伝的構造は近親交配がむしろ普通に行われていると考えられているという指摘と対照的であり、多数の遺伝子座を用いた詳しい調査が必要である。

一方、遺伝子型頻度がハーディー・ワインベルグの法則から外れ、ホモ個体の頻度が高い東海地方のYnIw個体群は個体密度ならびに寄主植物であるナシの葉の被害状況から、発生のごく初期の段階であると判断された。ハダニ類は移動能力が低いため、同じ寄主に次々に新しい個体が流入して来ることは考え難い。このため、発生のごく初期で個体がパッチ状に分布しているような状態では由来の異なる個体と出会う確率が低く、そのために近親交配の頻度が高まり、結果的にホモ接合体の頻度が高くなるものと考えられる。

b. PR型個体群における寄生性の変異と生殖的隔離

1). PR型内における寄生性の分化

北海道のヤマグワから採集されたHkSpはPR型個体群である（第4章-1-b，第7表）が、この個体群は他のナシ寄生型個体群に比べてエステラーゼ活性が顕著に低いことが示された（第4章-1-b，第6表）。そこでこの個体群の寄生性をさらに調査し、他の個体群と比較した。

材料および方法

供試した個体群は北海道のヤマグワから採集したHkSp (PR型), 島根県のナシから採集したSnIm (PR型) および神奈川県産カンキツ寄生のKgHt (CT型) である。雌成虫を寒天ゲル上に置いたナシまたはクワの葉片に移して2～3日間産卵させた。雌成虫を除いた後, 卵が付着している葉片を小片に切り分け, 20℃で風乾させた。乾燥した葉片上でふ化した幼虫を24時間以内に, 寒天ゲル上においた調査葉片 (2×2cm) に1個体ずつ移した。移した幼虫は20℃で飼育し, 成虫までの発育状況を調査した。

結 果

CT型のKgHtおよびPR型のSnIm個体群はいずれもクワでよく発育し, 発育率は90%前後であった (第13表)。SnImに比べてKgHtの方が発育が遅く, 発育期間は約10日であった。HkSpのクワでの発育率は70%で, 発育期間はSnImよりさらに短く,

第13表 CT型 (KgHt) およびPR型 (SnIm) 個体群のクワでの発育 (20℃)

個体群	エステ ラーゼ 型	供試 虫数	発育率	死亡率	逃亡率	発育日数 ^a		
						個体数	平均値±SE	
KgHt	CT	29	89.7%	0 %	10.3%	♀	19	10.3±0.3a
						♂	7	9.7±0.4a
SnIm	PR	29	93.1	6.9	0	♀	23	8.7±0.2b
						♂	4	7.8±0.8bc

^a 幼虫接種から成虫への脱皮までに要した日数。本表ならびに第14表中のアルファベットが異なるものはDuncanの多重検定において有意差が認められたことを示す (p<0.05)

第14表 北海道産HkSp個体群の数種植物葉での発育

供試植物	供試虫数	発育率	死亡率	逃亡率	発育日数 ^a		
					個体数	平均値±SE	
クワ	30	70.0%	13.3%	16.7%	♀	11	7.6±0.2c
					♂	10	6.7±0.2c
ナシ	60	3.3	43.3	53.4	♀	2	10.5(10-11) ^b
インゲンマメ	30	0	43.3	56.7			
シュウトウ	25	0	24.0	76.0			

^a 幼虫接種から成虫への脱皮までに要した日数, 第13表参照, ^b () は範囲

第15表 北海道のヤマグワから採集されたHkSp個体群（PR型）とナシ寄生のPR型およびCT型ミカンハダニおよびリンゴハダニの寄主範囲

		発育率 ^a				寄生型
		カンキツ	ナシ	クワ	インゲンマメ	
ミカンハダニ	PR型 (HkSp)	×	×	○	×	クワ
	PR型 (ナシ寄生)	× ^b	○ ^b	◎	○ ^c	ナシ
	CT型	◎ ^b	◎ ^b	◎	◎ ^c	カンキツ
リンゴハダニ ^d		×	○	◎	×	

^a ◎, 発育率 (D%) ≥ 80 ; ○, $80 > D \geq 60$; △, $60 > D \geq 30$; ×, $30 > D$

^b 第6章-2-a, 第20表参照, ^c Ashihara (1987), ^d Osakabe et al. (1990)

雌で7.6日, 雄で6.7日であった (第14表)。この個体群のナシでの発育率は3.3%で, 発育した雌2個体の発育期間は10および11日で, クワで発育したものに比べて長くなる傾向がみられた。また, インゲンマメとシュウトウでは発育する個体はみられなかった。

本章-2-aで述べるように, 発育率からみたCT型およびナシ寄生のPR型個体群の寄主範囲は, 非休眠系統と休眠系統として報告されているもの (真梶, 1961b; 内田, 1982; 森本・高藤, 1983) と同様であり, さらにAshihara (1987) の実験ではカンキツから採集された非休眠系統 (CT型) のインゲンマメでの発育率は80%以上であり, またナシ寄生の休眠系統 (PR型, SnImを供試) では66.7%であった。したがって, HkSp個体群の寄生性は, 第15表に示すように, CT型およびナシ寄生のPR型個体群のいずれとも異なり, さらに同胞種であるリンゴハダニ (Osakabe et al., 1990) とも異なっている。したがって, 以後はHkSpのようにクワだけで発育するものをナシ寄生型と区別し, クワ寄生型と呼ぶことにする。

2). PR型個体群間の生殖的隔離

遺伝的系統関係について検討する上で, 生殖的隔離に関する知見はきわめて重要である。Takafuji and Fujimoto (1985) およびTakafuji (1988) は休眠性の異なるミカンハダニ系統間の生殖的隔離をカンキツおよびナシから採集された個体群を用いて確認している。北海道のヤマグワから採集されたHkSp (PR型) 個体群はエステラーゼ活性 (第4章-1-b, 第6表) だけでなく, 寄生性の点でも他のPR型個体群とは異なりナシで発育できない (クワ寄生型; 第6章-1-b-1))。そこで本項では, HkSp個体群とCT型個体群およびナシ寄生型のPR型個体群との交配

実験を行い、生殖的隔離について調べた。

材料および方法

供試した個体群はクワ寄生型のHkSp (PR型)，ナシ寄生型のOyOy2' (PR型；第4章-1-a参照) およびカンキツ寄生型のHsAt2c (CT型) である。これらの個体群を数世代クワ葉片で飼育した後、交配実験に用いた。

交配前隔離：各個体群の中から、第三静止期の雌と雄をそれぞれ別々に寒天ゲル上のクワ葉片 (5×5cm) に移した。これらを20℃の恒温槽内に置き、翌日脱皮を終えた処女雌と未交尾雄を1cm角のクワ葉片に1個体ずつ移し、接種後10および20分以内の交尾率と交尾までに要した時間および交尾時間を調べた。交尾行動は実体顕微鏡下で観察した。このとき、葉片上の温度が24～27℃になるように室温を調整した。本実験では雄が雌の胴部下に入り交尾器を雌の胴部腹面に押し当てて静止した時点で交尾が成立し、交尾器を雌の胴部から離れた時点で交尾が終了したと判断し、雄の接種から交尾成立までを交尾前時間、交尾成立から終了までを交尾時間とした。

交配後隔離：各個体群の中から、第三静止期の雌を新しいクワ葉片に移し、20℃の恒温槽内に置いた。脱皮後1ないし2日目の処女雌と、飼育集団の中から任意に取り出した雄成虫を2cm角のクワ葉片上に1個体ずつ移し、交尾行動を確認した後、雄成虫を取り除いて20℃の恒温槽内に置いた。その後、産卵数を毎日調査し、産卵開始から5～7日間産卵させた。産下された卵は20℃で飼育を続け、最後の卵が産下されてから14日後にふ化率を調査した。また、ふ化幼虫については成虫までの発育率と性比を調査した。

結 果

交配前隔離の調査では、同一個体群内の交尾はいずれも接種から10分以内に85～92%が、20分以内ではほぼ90%以上が交尾を開始した (第16表)。交尾時間はナシ寄生型のOyOy2' で短く、平均6.6分であった。カンキツ寄生型のHsAt2cおよびクワ寄生型のHkSpの交尾時間は差がなく、約8分であった。

異なった個体群間交配においても交尾率は高く (第17表)、HsAt2c×HkSpで20分後の交尾率が69.4%であった他は、いずれの組み合わせにおいても10分後には70%以上が、また20分後には76%以上が交尾した。交尾時間は、HsAt2cとOyOy2' またはHkSpの正逆交配において顕著な差が認められ、いずれもHsAt2cを母系にした場合には個体群内交配の場合に比べて顕著に短くなり、HsAt2c×OyOy2' では3.4分、HsAt2c×HkSpでは2.1分であった。逆に、OyOy2' またはHkSpを母系とした場合にはこれらに比べて顕著に長く、OyOy2' ×HsAt2cでは8.5分、HkSp×HsAt2cでは10.1分

第16表 クワ寄生型 (HkSp, PR型), ナシ寄生型 (OyOy2', PR型) および
カンキツ寄生型 (HsAt2c, CT型) ミカンハダニの個体群内交配に
おける交尾率と交尾時間

交配組合せ (♀×♂)	交配数	交尾率 (%)		交尾時間 (分)。 (平均値±SD)
		10分後	20分後	
HkSp × HkSp	27	85.2	88.9	7.89±1.81c
OyOy2' × OyOy2'	29	86.2	93.1	6.63±1.19b
HsAt2c × HsAt2c	25	92.0	96.0	7.83±1.98c

。本表ならびに第17表中のアルファベットが異なるものはDuncanの多重検定において有意差が認められたことを示す ($p < 0.05$)

第17表 クワ寄生型 (HkSp, PR型), ナシ寄生型 (OyOy2', PR型) および
カンキツ寄生型 (HsAt2c, CT型) ミカンハダニの個体群間交配に
おける交尾率と交尾時間

交配組合せ (♀×♂)	交配数	交尾率 (%)		交尾時間 (分)。 (平均値±SD)
		10分後	20分後	
OyOy2' × HkSp	30	76.7	83.3	7.40±2.03bc
HkSp × OyOy2'	30	86.7	90.0	8.22±3.06c
HsAt2c × HkSp	36	61.1	69.4	2.14±1.34a
HkSp × HsAt2c	30	83.3	96.7	10.05±2.54d
HsAt2c × OyOy2'	29	75.9	75.9	3.38±2.27a
OyOy2' × HsAt2c	30	73.3	80.0	8.45±1.43c

。第16表参照

であった。これらPR型とCT型個体群間における交配実験の結果は、Takafuji and Fujimoto (1985) がカンキツとナシから採集した非休眠系統と休眠系統の正逆交配における交尾時間に顕著な有意差が生じるとした結果と一致した。一方、OyOy2' と HkSp との間では正逆交配による交尾時間の顕著な差はみられず、いずれも個体群内交配の場合とほぼ同じ長さであった。

交配後隔離の調査では、HsAt2cの1雌当りの産卵数は個体群内交配および個体群間交配のいずれの場合も15卵程度であった(第18表)。これに比べて、OyOy2' およびHkSpの雌成虫の産卵数は少なく、特に他の個体群と交配した場合には10卵以下であった。また、個体群内交配における産下卵のふ化率はHsAt2cで最も高く(97%)、HkSpおよびOyOy2'でもそれぞれ82%および70%と高かった(第19表)。発育率はHkSpで67%とやや低かったが、HsAt2cおよびOyOy2'ではそれぞれ95%お

第18表 交配組合せと産卵数

交配組合せ (♀×♂)	雌成虫数	1雌当り産卵数 ^a 平均値±SD
HsAt2c×HsAt2c	15	14.9±6.0d
OyOy2'×OyOy2'	17	11.1±7.5bcd
HkSp×HkSp	18	12.1±8.1cd
HsAt2c×HkSp	19	15.2±3.4d
HkSp×HsAt2c	24	7.3±6.3ab
OyOy2'×HkSp	32	6.2±4.9a
HkSp×OyOy2'	24	9.5±7.1abc

^a 表中のアルファベットが異なるものはDuncanの多重検定において有意差が認められたことを示す ($p < 0.05$)

第19表 クワ寄生型 (HkSp, PR型), ナシ寄生型 (OyOy2', PR型) およびカンキツ寄生型 (HsAt2c, CT型) ミカンハダニの個体群内および個体群間交配による次世代の発育と性比

交配組合せ (♀×♂)	交配数	調査卵数	ふ化率 (%)	発育率 ^a (%)	産雌々率 ^b (%)	次世代 ^c の性比
HsAt2c×HsAt2c	15	223	96.9	94.8	93.3	0.66
OyOy2'×OyOy2'	17	186	69.9	81.7	100	0.79
HkSp×HkSp	18	214	81.8	67.3	80.0	0.49
HsAt2c×HkSp	19	289	97.2	97.9	0	0
HkSp×HsAt2c	24	175	50.3	63.0	0	0
OyOy2'×HkSp	32	198	56.1	84.5	24.0	0.13
HkSp×OyOy2'	24	226	67.7	68.2	5.3	0.01

^a ふ化幼虫の発育率で未ふ化卵は含まない

^b 次世代で成虫の得られなかったものは除く

^c 雌成虫数 / (雌成虫数 + 雄成虫数)

および82%と高かった。産雌々率はいずれも80%以上で、次世代の性比はHsAt2c, OyOy2'およびHkSpでそれぞれ0.66、0.79および0.49であり、発育した個体の約半数以上が雌であった。

HsAt2cとHkSpの個体群間交配では、HsAt2cを母系とした場合にはふ化率および発育率がいずれも高く、97%以上であった。逆に、HkSpを母系とした場合にはふ化率が50%で、発育率もやや低かった。また、正逆交配のいずれにおいても雌は得られなかった。一方、OyOy2'とHkSpの交配ではいずれを母系にした場合もふ化

率が低く、 $OyOy2' \times HkSp$ および $HkSp \times OyOy2'$ でそれぞれ56および68%であった。次世代の発育率は母系の個体群内交配とほぼ同等で $OyOy2' \times HkSp$ では85%、 $HkSp \times OyOy2'$ では68%であった。産雌々率は $OyOy2' \times HkSp$ および $HkSp \times OyOy2'$ でそれぞれ24および5%で、次世代の性比はそれぞれ0.13および0.01であり、個体群内交配に比べていずれも極めて低かった。

3). ま と め

$HkSp$ 個体群のエステラーゼ型はPR型であり、休眠系統でカンキツでは発育できない（第4章-1-a, 第4表; 第4章-2-b, 第7表）。しかし、この個体群はナシやインゲンマメでも発育できず（クワ寄生型）、また他のPR型個体群との間に生殖的不和合性があることが明らかになった。井上（1972）はカンキツ寄生型（非休眠系統）の個体群間交配において F_2 卵のふ化率が低下することを示した。また、Takafuji and Fujimoto（1985）は同系統内の地域個体群間に生殖的不和合性はないが、休眠系統の個体群間交配では F_1 の卵のふ化率および発育率が個体群内交配の場合に比べて低いことを指摘している。これらに対して、 $HkSp$ と他のPR型個体群（ $OyOy2'$ ）との交配では F_1 の得られる確率がきわめて低く、井上（1972）およびTakafuji and Fujimoto（1985）が示した例に比べて、生殖的隔離がさらに進んでいることが明らかになった。寄生性の変異と生殖的不和合性のいずれが先に生じたか、またこれら個体群間の系統関係は不明であるが、 $HkSp$ 個体群と他のPR型個体群は遺伝的に分化しつつあることは明らかで、CT型個体群および同胞種のリンゴハダニを含めた遺伝的な系統関係に興味を持たれる。

Watanabe and Kawanishi（1979）はショウジョウバエ科の近縁種間における生殖的隔離について、一方向的交尾選択に基づいた種分化モデルを構築した。この種分化モデルでは2つの近縁種間の正逆交配が行われた場合、祖先種の雄は分化種（新しい種）の雌との交尾成功率が低く、逆に分化種の雄は祖先種の雌との交尾が成立し易いと考えられている。この場合、用いられているのは一定時間内における交尾率である。ミカンハダニの休眠性の異なる個体群間では交尾率に顕著な差はみられない。したがって、ミカンハダニの生態的変異に関してWatanabe and Kawanishi（1979）の種分化モデルを直接導入することはできない。しかし、これらの正逆交配では交尾時間に顕著な差がみられ、またTakafuji（1988）は休眠性の異なる個体群の第三静止期の雌に対する雄成虫のガード行動において、非休眠系統の雄は非休眠および休眠系統のいずれの雌も同じ確率でガードするのに対して、休眠系統の雄は同系統の雌をガードする確率が高いことを指摘しており興味深い。生殖行動におけるこれらの不均衡が交配前隔離としての意味を持つか

否かについては、雄から雌への精子の移入および卵巣までの精子の移動経路などの点から今後検討する必要がある。

2. 寄生性の変異の要因

第3章-1ではCT型ミカンハダニのエステラーゼの活性は寄主植物の種類によって変化し、カンキツでは高く、ナシでは低くなることを明らかにした。本章では数種の植物におけるCT型（カンキツ寄生型）とPR型（ナシ寄生型）のミカンハダニの発育とエステラーゼ活性を調査し、寄主植物の種類とエステラーゼ活性との関係について解明した。

a. 数種の植物におけるCT型およびPR型個体群の発育

材料および方法

供試した個体群はCT型のKgHtおよびPR型のTtDelである。飼育個体群中から雌成虫を任意に取り出し、微量のクリスタルバイオレットを含んだ寒天ゲル（0.5%）上に置いたカンキツ（シュウトウ）（KgHt）またはナシ（TtDel）の葉片（1×1 cm）に1葉片当り3個体ずつ移した。2日間産卵させた後、接種した雌成虫を除いた。卵が付着している葉片を寒天ゲルから剥し、3日間風乾させた。その後、乾燥した葉片を寒天ゲル上の調査植物の葉片に乗せ、9日後にミカンハダニの発育状況を調査した。調査に用いた植物はカンキツ類ではウンシュウミカン Citrus unshiu Marc., シュウトウ C. aurantium L., ハッサク C. hassaku hort. ex Tanaka, ヌズ C. junos Sieb. ex Tanaka, トロイヤーシトレンジ（カラタチ Poncirus trifoliata Raf.×ワシントンネーブル C. sinensis Osbeck var. brasiliensis Tanaka）およびカラタチで、その他はナシ Pyrus serotina Rehder var. culta Rehder, モモ Prunus persica Sieb. et Zucc. var. vulgaris Maxim., リンゴ Malus pumila Mill. var. domestica Schneider, ブドウ Vitis vinifera L., クリ Castanea crenata Sieb. et Zucc., ビワ Eriobotrya japonica Lindley, モクセイ Osmanthus fragrans Lour. var. aurantiacus Makinoおよびヒイラギモクセイ Osmanthus Fortunei Carr.である。ハダニの飼育はすべて25℃の実験室内で行った。

第20表 異なった寄主植物におけるCT型 (KgHt) およびPR型 (TtDe1)
ミカンハダニの発育

供試植物	CT型		PR型	
	供試虫数	発育率	供試虫数	発育率
カンキツ類				
ウンシュウミカン	41	95.1%	409	2.0%
シュウトウ	34	82.4	215	6.0
ハッサク			272	1.8
ユズ			318	5.3
トロイヤーシトレンジ			115	0
カラタチ	93	97.9	285	95.4
ナシ	56	92.9	227	79.7
モモ	57	91.2	137	74.5
リンゴ	111	36.0	347	15.3
ブドウ	47	19.1	202	0
クリ	53	5.7	276	0
ビワ	53	0	202	0
モクセイ	50	2.0	328	0
ヒイラギモクセイ	30	0	152	0

第21表 CT型およびPR型個体群の発育率による供試植物のグループ分け

GRP1	:	CT型だけが発育	カラタチを除くカンキツ類
GRP2	:	CT型およびPR型が発育	ナシ, モモおよびカラタチ
GRP3	:	両型とも発育不良	リンゴ, ブドウ, クリ, ビワ, モクセイ, ヒイラギモクセイ

結 果

CT型のKgHt個体群はカンキツ類およびナシ, モモで80%以上の個体が成虫まで発育した(第20表)。一方, PR型のTtDe1個体群もナシおよびモモではよく発育し, 発育率は75%以上であったが, カンキツ類では発育率がきわめて低く, 6%以下であった。しかし, カラタチではTtDe1もきわめてよく発育した。また, その他の植物では両個体群とも発育率が低かった。したがって, 供試した植物は第21表に示す3つのグループ, すなわち, CT型だけが発育するGRP1, CT型とPR型がいずれもよく発育するGRP2およびいずれも発育率が低いGRP3に分けられた。

b. PR型個体群のトロビタオレンジとカラタチの体細胞雑種における発育

近年の生物工学的技術の発展により、トロビタオレンジとカラタチの細胞融合と融合体からの植物の再分化が成功し、体細胞雑種が育成された (Ohgawara et al., 1985)。一方、ミカンハダニのPR型個体群はカンキツ類ではほとんど発育できないが、その中でカラタチだけは例外的にナシ寄生型もよく発育する。PR型個体群の前記体細胞雑種における発育の可否は、ミカンハダニの寄生性の変異機構について検討する上できわめて興味深い。そこで、体細胞雑種のクローンにおけるPR型個体群の発育を調査した。

材料および方法

供試した個体群は島根県のナシから採集したPR型のSnImであり、トロビタオレンジとカラタチの体細胞雑種は果樹試験場安芸津支場の圃場で栽培されているクローンの内、No.1-1, No.2-1およびNo.3-3の3クローン (Ohgawara and Kobayashi, 1991) を用いた。

SnIm個体群を寒天ゲルに乗せたナシ葉片で飼育し、卵が産み付けられた葉片をゲルから剥し、小片に切り分けて2日間風乾させた。風乾した葉片を寒天ゲルに乗せたトロビタオレンジ、体細胞雑種3クローン、カラタチおよびナシ葉片上に移した。これらの葉片上でふ化した幼虫を24時間以内に新しい葉片 (2×2 cm) に1個体ずつ移し、成虫までの発育率を調査した。なお、ハダニの飼育は20℃の恒温槽内で行った。

結 果

SnIm個体群はナシおよびカラタチでは80%以上の個体が発育し、発育日数はいずれも7日程度であった (第22表)。これに対して、トロビタオレンジでは発育率がきわめて低く、わずか3.3%であった。また、発育した1個体 (♂) の発育期間は16日で、ナシおよびカラタチで発育した個体に比べて2倍以上の期間を要した。この個体群はトロビタオレンジとカラタチの体細胞雑種3クローンにおいてもほとんど発育しなかった。また、クローンNo.1-1で発育した3個体 (♀) の発育日数は、トロビタオレンジの場合と同様に、ナシおよびカラタチで発育したものに比べて顕著に長かった。

第22表 トロピタオレンジとカラタチの体細胞雑種におけるPR寄生型個体群 (SnIm) の発育(20℃)

供試植物	供試虫数	発育率	死亡率	逃亡率	発育個体数	発育日数 ^a 平均値±SE
トロピタオレンジ	30	3.3%	56.7%	40.0%	♂ 1	16
体細胞雑種1-1	30	10.0	33.3	56.7	♀ 3	17.7(16-20) ^b
体細胞雑種2-1	30	0	10.0	90.0		
体細胞雑種3-3	30	0	20.0	80.0		
カラタチ	29	82.8	3.4	13.8	♀ 12 ♂ 12	7.0±0.9 6.8±0.5
ナシ	27	85.2	14.8	0	♀ 14 ♂ 9	7.1±0.5 6.7±0.9

^a 幼虫接種から成虫への脱皮までに要した日数, ^b () 内は最短-最長

c. 寄主植物の種類がCT型個体群のエステラーゼ活性に及ぼす影響

材料および方法

供試虫はCT型のKgHt個体群と果樹試験場安芸津支場内のウンシュウミカン、ユズ、ハッサク、シュウトウ、トロイヤートレンジ、ワシントンネーブル、カラタチおよびナシに自然発生していたミカンハダニ (HsAt2) である。これらの雌成虫についてアガロースゲル電気泳動法によりエステラーゼ分離パターンを調査した。また、アガロースゲルから泳動帯が検出された部分をすべて切り取り、それぞれ1 mlのリン酸緩衝液中にいれ、85~90℃に加熱して溶解させた。これらの溶液の吸光度 (550nm) を分光光度計で測定し、個々の泳動帯の活性を示した。また、これらの結果を基に寄主植物とエステラーゼ活性との関係を多変量解析により分析した。

結 果

KgHt個体群のナシおよびモモ (GRP2) で発育した個体では、ウンシュウミカンおよびシュウトウ (GRP1) で発育したものに比べて、E₃およびE₄泳動帯の活性が明らかに低かった ($p < 0.05$) (第23表)。E₅泳動帯ではウンシュウミカンで発育した個体の活性はGRP2で発育した個体に比べて顕著に高かった ($p < 0.05$) が、シュウトウとGRP2の間では差はみられなかった ($p > 0.05$)。また、GRP1の個体のE₃/E₄およびE₃/E₅の活性比はGRP2の個体に比べて明らかに大きかったが、

第23表 異なった植物で発育したCT型飼育個体群 (KgHt) のエステラーゼ活性

寄主植物	標本数	O.D. ($\times 10^{-3}$) \pm SE ^a		
		E ₃	E ₄	E ₅
GRP1				
ウンシュウミカン	4	318 \pm 26a	334 \pm 11a	224 \pm 8a
シュウトウ	4	305 \pm 32a	269 \pm 15b	159 \pm 13b
GRP2				
ナ シ	4	110 \pm 13b	198 \pm 16c	154 \pm 17b
モ モ	4	91 \pm 19c	153 \pm 27c	155 \pm 18b

^a 表中同列のアルファベットが異なるものはダンカンの多重検定により有意差が認められた ($p < 0.05$) ことを示す。

第24表 異なった植物で発育したCT型飼育個体群 (KgHt) のエステラーゼ活性の相対比

寄主植物	活性比 \pm SE ^a		
	E ₃ /E ₄	E ₃ /E ₅	E ₄ /E ₅
GRP1			
ウンシュウミカン	0.95 \pm 0.05a	1.41 \pm 0.07a	1.49 \pm 0.05ab
シュウトウ	1.13 \pm 0.08b	2.00 \pm 0.38a	1.74 \pm 0.22a
GRP2			
ナ シ	0.55 \pm 0.03c	0.71 \pm 0.04b	1.31 \pm 0.12ab
モ モ	0.57 \pm 0.04c	0.60 \pm 0.13b	1.02 \pm 0.17b

^a 第23表参照

E₄/E₅では明瞭な差はみられなかった (第24表)。

野外のGRP1から採集された個体のエステラーゼ活性は、ネーブルオレンジを除けば、いずれの泳動帯においてもカラタチとナシ (GRP2) のものに比べて高い傾向がみられた (第25表)。中でも、ウンシュウミカンとユズではすべての泳動帯においてGRP2より有意に活性が高かった ($p < 0.05$)。また、E₃/E₄およびE₃/E₅の活性比はいずれもGRP1の方がGRP2より高く、トロイヤーシトレンジとカラタチの場合を除けば、いずれも有意差が認められた ($p < 0.05$) (第26表)。E₄/E₅については、ウンシュウミカンとシュウトウではGRP2より有意に大きな活性比がみられた ($p < 0.05$) が、GRP1のその他の寄主ではGRP2との間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

第25表 異なった植物から採集したCT型野外個体群 (HsAt2) のエステラーゼ活性

寄主植物	標本数	O.D. ($\times 10^{-3}$) \pm SE ^a			
		E ₂	E ₃	E ₄	E ₅
GRP1					
ウンシュウミカン	8	231 \pm 22a	551 \pm 56a	584 \pm 41a	319 \pm 7a
ユズ	8	267 \pm 30a	316 \pm 51a	406 \pm 47a	308 \pm 32a
ハッサク	8	193 \pm 38ab	213 \pm 42b	302 \pm 58b	224 \pm 46b
シュウトウ	8	123 \pm 19bcd	227 \pm 34b	292 \pm 38b	154 \pm 24bcd
トロイヤーシトレンジ	4	200 \pm 37abc	173 \pm 36bc	251 \pm 50bcd	178 \pm 37bcd
ネーブルオレンジ	8	99 \pm 19d	118 \pm 11c	158 \pm 15d	102 \pm 12d
GRP2					
カラタチ	12	105 \pm 18d	126 \pm 14c	191 \pm 24bc	173 \pm 13bc
ナシ	8	115 \pm 19cd	58 \pm 12c	170 \pm 6cd	126 \pm 10cd

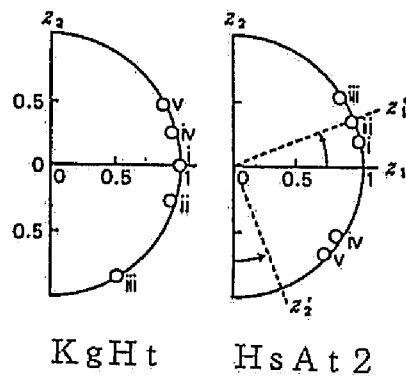
^a 第23表参照

第26表 異なった植物から採集したCT型野外個体群 (HsAt2) のエステラーゼ活性の相対比

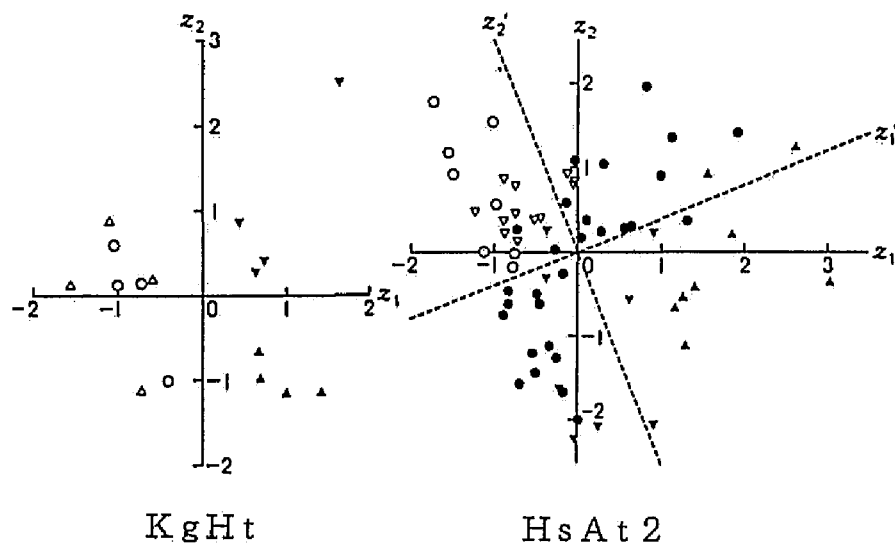
寄主植物	活性比 \pm SE ^a		
	E ₃ /E ₄	E ₃ /E ₅	E ₄ /E ₅
GRP1			
ウンシュウミカン	0.94 \pm 0.05a	1.74 \pm 0.08a	1.86 \pm 0.05a
シュウトウ	0.78 \pm 0.05ab	1.55 \pm 0.16a	1.98 \pm 0.12a
ネーブルオレンジ	0.75 \pm 0.04bc	1.24 \pm 0.14b	1.65 \pm 0.19ab
ハッサク	0.70 \pm 0.04bc	0.98 \pm 0.05b	1.40 \pm 0.08b
ユズ	0.76 \pm 0.05abc	0.99 \pm 0.06b	1.31 \pm 0.04b
トロイヤーシトレンジ	0.68 \pm 0.01bcd	0.97 \pm 0.03bc	1.42 \pm 0.04b
GRP2			
カラタチ	0.48 \pm 0.01d	0.71 \pm 0.04cd	1.47 \pm 0.06b
ナシ	0.35 \pm 0.07e	0.46 \pm 0.09d	1.34 \pm 0.09b

^a 第23表参照

主成分分析: E₃, E₄およびE₅泳動帯の活性とE₃/E₄およびE₃/E₅の活性比を変数とし, それらの相関行列を用いて主成分分析を行った. この結果, 第1主成分 (z₁) と第2主成分 (z₂) の変数に対する累積寄与率はKgHtで96.4%, HsAt2で95.5%であった. 因子負荷量によればKgHtのスコア散布図のz₁軸はE₃, E₄泳動帯の活性とE₃/E₄およびE₃/E₅の活性比を示している (第38図). この個体群のスコア散布図ではGRP1の個体のz₁スコアはすべてGRP2より大きかった (第39図). HsAt2については因子負荷量 (第38図) を基に座標軸を回転させ, 新しい座標軸を



第38図 CT型飼育個体群 (KgHt) および野外個体群 (HsAt2) の第1 (z_1) および第2 (z_2) 主成分の因子負荷量 (i: E_3 , ii: E_4 , iii: E_6 , iv: E_3/E_4 , v: E_3/E_6)



第39図 CT型飼育個体群 (KgHt) および野外個体群 (HsAt2) の第1 (z_1) および第2 (z_2) 主成分の散布図 (GRP1 ▲, ウンシュウミカン; ▼, シュウトウ, ●: ユズ, ハッサク, ワシントンネーブルおよびトロイヤーシトレンジ; GRP2—○: ナシ, △: モモ, ▽: カラタチ)

それぞれ z_1' および z_2' とした（第39図）。これによって、 z_1' 軸は E_3 、 E_4 および E_5 泳動帯の活性を示す。また、 E_3/E_4 および E_3/E_5 の活性比が大きい場合には z_2' 軸で小さな値をとることになる。この場合、GRP1の個体のスコアは座標面に広く分布し、GRP1とGRP2の相違はKgHtの場合ほど明瞭ではなかった。しかし、GRP1とGRP2のスコア分布の傾向は異なり、GRP1の多くの個体が z_1' 軸で正または z_2' 軸で負の値を示したのに対して、GRP2の多くは z_1' 軸で負で、 z_2' 軸で正の値を示した。これらの中で特にウンシュウミカンの個体ではGRP2との間に顕著な相違がみられた。

判別分析：分析に用いた変数は主成分分析の場合と同じである。また、判別分析に先立ち、KgHtとHsAt2の両個体群についてHotellingの T^2 検定を行った結果、いずれもGRP1とGRP2の間に有意な差が認められた（ $p < 0.01$ ）。そこでそれぞれの個体群についてGRP1とGRP2の判別関数を作成し、

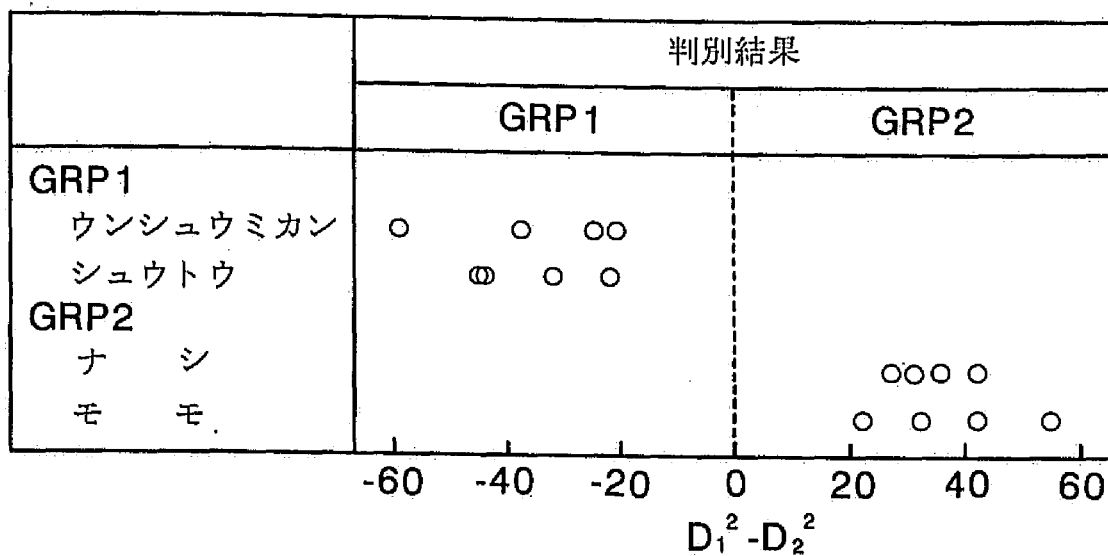
$$\text{KgHt: } z = -40.822 + 130.068x_1 + 80.320x_2 - 154.036x_3 + 63.596x_4 - 24.873x_5$$

$$\text{HsAt2: } z = -15.838 - 21.538x_1 - 11.037x_2 + 42.975x_3 + 14.800x_4 + 6.436x_5$$

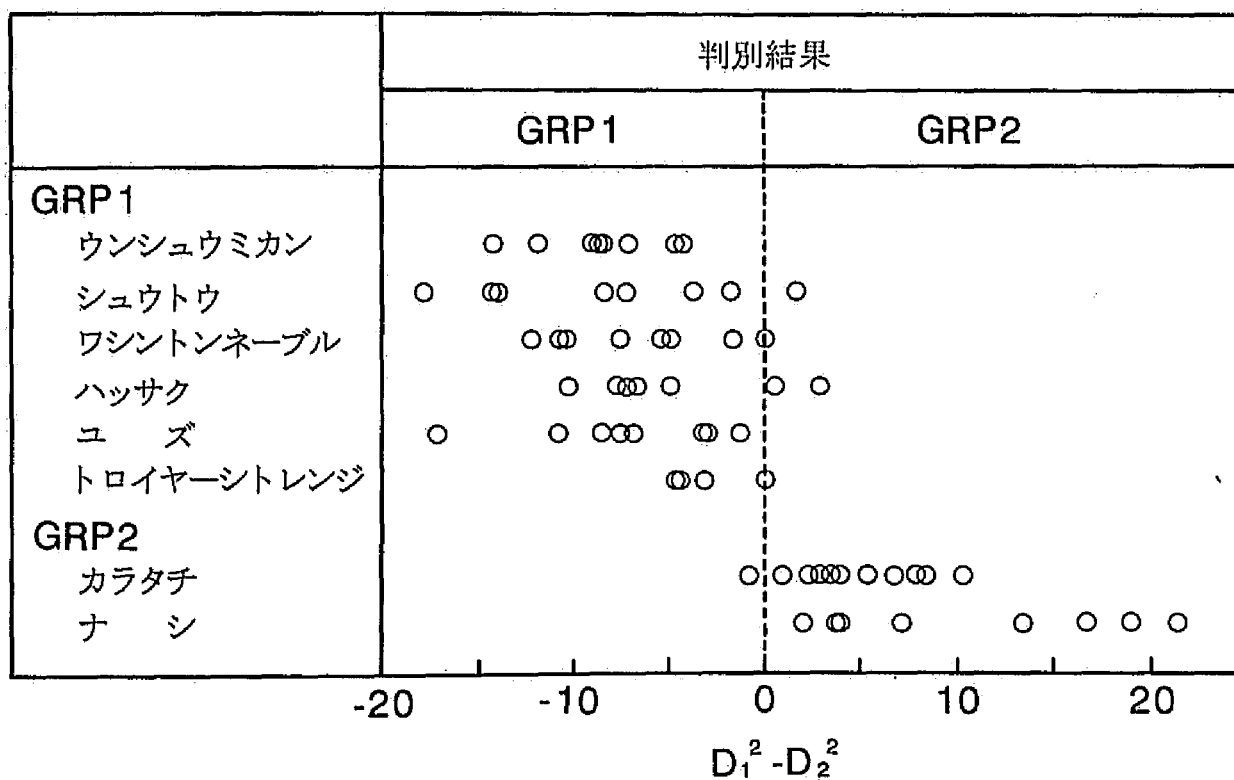
（ $x_1 \sim x_3$ 、 E_3 、 E_4 および E_5 の活性； x_4 および x_5 、 E_3/E_4 および E_3/E_5 の活性比）

これらの式を用いて各個体の寄主植物を判定する場合の誤判別の確率はKgHtとHsAt2でそれぞれ0.1%および9.3%であった。

第40図と第41図にはエステラーゼ活性を調査した各個体の寄主植物の判別結果を、GRP1とGRP2からのMahalanobis'汎距離の差（ $= -2z$ ）として示した。これによるとKgHtの各個体はすべて正しく寄主植物が判定された（第40図）。主成分分析の場合と同様に、HsAt2ではGRP1とGRP2の相違はKgHtほど明瞭ではないが、90%の個体の寄主植物は正しく判定された（第41図）。この場合、4個体で誤判別が生じ、2個体は判定できなかった。また、この個体群ではウンシュウミカンとナシの差異が最も明瞭であった。



第40図 CT型飼育個体群 (KgHt) の寄主植物間におけるMaharanobis'汎距離の
差異 (D_1 , D_2 : GRP1およびGRP2からの距離)



第41図 CT型野外個体群 (HsAt2) の寄主植物間におけるMaharanobis'汎距離の
差異 (D_1 , D_2 : GRP1およびGRP2からの距離)

d. ま と め

本実験で用いた植物の中で、PR型（ナシ寄生型）のTtDelは、カンキツ類の中では例外的にカラタチで非常に高い発育率を示した。しかし、カラタチとワシントンネーブルの交配雑種であるトロイヤーシトレンジやトロビタオレンジとカラタチの体細胞雑種ではほとんど発育しなかった。このように、カラタチが交雑および細胞融合によりPR型個体群の寄主植物として不適なものに変化することは、ミカンハダニの寄生性の変異機構を検討する上で興味深い。数種の広食性の昆虫類では植物の二次物質によりmixed-function oxidase (Brattsten et al., 1977; Yu, 1982a; Ahmad, 1983; Yu and Ing, 1984) やグルタチオンS-トランスフェラーゼ (Yu, 1982b) など薬物の代謝に関わる酵素系が誘導され、このため寄主植物の種類により薬物に対する感受性が変化する (Berry et al., 1980)。寄主植物による酵素誘導はナミハダニでも生じており、エステラーゼを含む数種の薬物分解酵素の活性が変化する (Mullin and Croft, 1983)。また、ユキヤナギアブラムシ *A. citricola* van der Gootでは特定のエステラーゼ泳動帯の活性がカンキツ類に寄生した場合に高くなり、他の寄主植物に寄生した場合にはほとんど消失してしまう (駒崎, 1991)。ミカンハダニでも同様の現象がみられ、駒崎 (1991) も指摘しているように、この活性の変化は前述のような植物の二次物質による薬物分解酵素の誘導と関連しているように思われる。PR型がカラタチでは発育するが、カラタチと他のカンキツ類との雑種において発育できない事実は、他のカンキツ類がPR型に対して発育阻害もしくは忌避作用のある二次物質を有することを暗示しているとも考えられる。筆者は、カンキツからの粗抽出物がCT型とPR型のいずれの幼虫に対しても顕著な忌避あるいは発育阻害作用を示すことを確認しており、この点からも前述の二次物質の影響が示唆される。したがって、ハダニ類のカンキツに対する寄生性については、今後生化学的な面からも検討する必要がある。

第7章 総合考察

かつて日本のナシやクワへの寄生が報告されていたナシハダニ *Tetranychus* sp. (矢後・古郡, 1937a, 1937b) およびクワオオハダニ *Panonychus mori* Kishida (横山・石井, 1934) は、ミカンハダニ *P. citri* (McGregor) であることが Ehara (1955, 1956) により確認された。近年になって本種の休眠系統の地理的分布が変化していること (山田・野田, 1985; 真梶ら, 1986), またその休眠性の有無がナシ園における発消長にも影響を及ぼしていることが指摘され (Takafuji and Morimoto, 1983; Takafuji and Fujimoto, 1986; 孫ら, 1988) 防除上の問題になっている。このため、個体群間の休眠性や寄生性の変異について、遺伝的関係や形態的差異などの詳細な調査が必要になった。しかし、生態的変異を個体ごとに識別する手法が確立されていないため、これらの調査は困難であった。

本研究では、このミカンハダニについて、寄主植物あるいは地域を異にする個体群のエステラーゼアイソザイムを検討した。その結果、明確に区別される2つのエステラーゼ型が存在し、さらにそれらが前述の休眠性や寄生性の変異に対応していることを明らかにした。これによって、ミカンハダニの生態学的研究の発展の障害になっている生態的変異の識別法を確立し、その生態的変異がエステラーゼアイソザイムによって個体ごとに判別できることを示した。また、休眠性とエステラーゼ型ならびに寄生性とエステラーゼ型がそれぞれ同様に一致していることから、休眠性と寄生性が連鎖していることも間接的に証明した。このため、これら2つの生態的変異をエステラーゼ型 (CT型およびPR型) により同時に識別することができるようになった。

ハダニ類の休眠性の変異に関してはナミハダニ *T. urticae* Koch でよく研究されており (高藤ら, 1981, 1989; Helle, 1985; Veerman, 1985), 地域個体群間で休眠率に差があることが知られている (後藤・真梶, 1981; Goka and Takafuji, 1990)。また、ナミハダニでは休眠性の異なる個体間の交配が可能なため、種々の遺伝学的研究も行われている (Helle, 1968; Ignatowicz, 1985; Goka and Takafuji, 1991)。しかし、ミカンハダニの系統間にみられる生態的形質の差異は遺伝的に安定したものであることが、エステラーゼ型との比較によって明らかである。また、飼育および交配実験の結果から休眠性が異なる個体群間に強い生殖的隔離が生じていることが指摘されており (Takafuji and Fujimoto, 1985; 高藤, 1986; Takafuji, 1988), このことはエステラーゼ型をもとに分類された個体群を用いた本実験の結果からも明らかである。生態的形質の差異の遺伝的安定性とエステラーゼ型間における生殖的隔離が確認されたことにより、前述の飼育および交配実験によって示された生殖的隔離が、各地の個体群において普遍的

に存在することが示唆された。したがって、ミカンハダニ系統間の生態的形質の差異は、ナミハダニにおける休眠性の変異とは遺伝的背景が明らかに異なり、すでに遺伝的に分化が完了していると考えられる。

平嶋ら（1989）は昆虫の分類に用いる形質として形態的形質、生理的形質、遺伝的な（不）稔性、生態的な形質および行動学的な形質の5つを挙げている。ミカンハダニ系統（エステラーゼ型）間の差異をこれらの分類形質に照らしてみると、休眠性および寄生性の相違は明らかに生態的形質の差異であり、エステラーゼ型の相違は生理的形質の差異である。また、生殖的隔離の存在は遺伝的な不稔性に他ならない。このように、ミカンハダニの系統間では前述の5つの分類形質の内、3つの形質において差異がみられる。特に、遺伝的不稔性は生物学的種の定義に相当するものであり、ミカンハダニの両系統は生物学的には別種であると判断される。さらに本研究では雌成虫の爪間体の形状や背毛の長さの比率などの形態的形質においても系統間に差異があることが明らかになった。爪間体の形状はハダニ類の属の検索（江原，1975c）や、属間の系統関係の検討（Gutierrez and Helle, 1985）に用いられている形質である点で興味深い。最近では両系統の雄成虫の挿入器の形状にも差異があることが指摘されている（国本ら，1991）。これらの事実はいずれも、ミカンハダニのいわゆる休眠系統（PR型）と非休眠系統（CT型）が別種として記載されるべきであることを示している。

ミカンハダニはナミハダニやリンゴハダニ *P. ulmi* (Koch) と並び農業上の重要害虫の一種である。また、その寄主範囲は広く、江原（1975c）はその寄主植物としてカンキツ類やナシ、モモなどの果樹をはじめ12種をあげている。これらに加えて、Ashihara（1987）はミカンハダニが野外でインゲンマメに寄生し、正常に発育することを実験的に確認している。しかし、前述の論点からCT型ミカンハダニとPR型ミカンハダニは別種として扱われるべきであると考えられることから、このハダニの寄主範囲については、Osakabe（1987a, b）のようにエステラーゼ型との関係に基づいて調査するか、もしくは真梶（1961b）や内田（1982）、森本・高藤（1983）などのように休眠性を調査した上で検討される必要がある。一方、緒言でも述べたように、ナシ園などにおける休眠系統（PR型）の地理的分布の変化（山田・野田，1985）や年次・地域による発生系統の変化（真梶ら，1986）を把握するために、農業の現場においてもこれら両変異型を識別する必要がある。これらがエステラーゼ型により迅速に識別できることは本研究の結果から明白であるが、電気泳動法を診断技術として採用するためには器材と技術的熟練が必要である。これに対して、雌成虫の背毛長の比率はプレパラート標本により検定が可能な点で、診断技術として普及する上では電気泳動法に比べてより現実的である。ハダニ類の標本作成に関しても、従来、技術的な熟練が必要であったが、著

者らは固定液中でハダニ類の脚を伸長させる方法を考案し、標本作成に当たっての技術的な困難さを緩和することに成功した（斎藤・刑部，未発表）。したがって、背毛長の比率をもとに判別式が作成されれば、それによって形態的な系統識別法の実用化が可能になる。

種内における様々な遺伝的変異とその隔離機構は遺伝的分化を生じさせる重要な要因である。しかし、その一方で種々の環境要因が遺伝的構成に及ぼす影響の強さは、それを受ける生物の生態的特性や遺伝的特性によって異なる。例えば、地理的に同じ条件に複数種の生物がおかれた場合、集団の細分化と隔離の程度は個々の生物の移動・分散能力と関係がある。飛翔能力の高い昆虫は地理的に比較的離れたところにいる個体間でも交尾可能なため、飛翔能力に比べて強い物理的な障壁が生じないと隔離は起こり難い。したがって、比較的広い地域を背景にした大きな集団の形成が可能である。これに対して、飛翔能力が乏しく、効率的な移動・分散手段を持たない昆虫では距離をおいた個体間の交尾は事実上不可能であり、恐らく比較的狭い地域で分集団を形成せざるを得ないであろう。また、物理的に少しの障害（大きな池や川あるいは不連続な寄主植物の分布など）があればそれが隔離の原因になるかも知れない。ハダニ類は人為的な運搬や昆虫あるいは鳥類などに付着して運搬される場合を除けば、歩行と風（刑部，1967）による分散が主な移動手段であり（真梶，1975），長距離にわたる移動が頻繁に起きているとは考え難い。このため、環境要因によって集団が細分化され易く、比較的狭い地域で繁殖集団を形成していると考えられる。事実 de Boer (1981, 1985) は、オランダからフランスに至る海岸線に生息するナミハダニでは、30km以上離れた地域個体群間に通常高い "Infertility barrier" があることを示した。このことは、ハダニ類が地域ごとに小さな集団を形成している一例である。

後代の遺伝子頻度に影響を及ぼす要因として、個々の生物の繁殖様式がきわめて重要である。ハダニ類（例えばナミハダニやミカンハダニ）では、雌成虫が同種の雄と複数回の交尾を行った場合、1回目の交尾が正常であれば、その雄の精子でほとんどの卵が受精し、2回目以降の交尾が無効になることが知られている（Boudreaux, 1963; Helle, 1967; Takafuji, 1986; 高藤, 1986）。生息密度が極端に高くない場合には一般に雌に比べて雄の比率が低いため、複数の雌と有効な交尾を行っている可能性が高く、それらの雌は同一個体の雄の遺伝子を子孫に伝えることになる。Helle and Overmeer (1973) によれば、雌成虫は通常一枚の葉に多数の卵を産下し、発育期間中に生息密度が過剰にならない限り子孫の分散はおこらず、兄妹交配が頻繁に行われることや、また系統の異なるハダニが同じ場所にいる場合には同系統内での交配が優先して行われることなどが報告されている。ハダニ類のこれらの繁殖様式に関する特性は、集団の近交係数を高める方

向に働くであろう。

ハダニ類の染色体数は $n=2\sim7$ で、多くは雌が2倍体($2n$)で雄が半数体(n)である(Helle and Pijnacker, 1985)。これらの種では通常産雄単為生殖が行われ、交尾雌は受精卵と未受精卵を、処女雌は未受精卵のみを産卵し、受精卵が雌に、未受精卵はすべて雄になる。雌が2倍体で雄が半数体である生物では有害なあるいは致死的な遺伝子の頻度が、雌雄共に2倍体の生物に比べて速やかに集団中で低下し、これとは逆に生存に有利な突然変異が生じた場合、雄が半数体となる遺伝子座では2倍体の場合に比べて早く固定されると考えられる(Hartl, 1972; Crozier, 1985; 刑部, 1991)。さらにハダニ類では個体群増殖率が高く、また他の生物に比べて突然変異率が高い($\times 10^{-4}$) (Helle and van Zon, 1967)ことから、優れた適応能力を持っていることが予想され、実際に進化速度が速いことを示す報告も幾つかある(Helle and Overmerr, 1973)。

このような繁殖様式や遺伝的特性にもとづく環境適応の顕著な例として、カンキツ類に寄生するミカンハダニやチャのカンザワハダニ *T. kanzawai* Kishida などにおける顕著な薬剤抵抗性の発達(井上, 1986, 1989; 刑部, 1973a, b; 桑原, 1984b)が挙げられる。一方、数種の広食性の昆虫類においては、寄主植物の二次物質の代謝のために薬物の代謝に関わる酵素系が誘導され、結果的に薬剤感受性が変化する(Brattsten et al., 1977; Berry et al., 1980; Yu, 1982a, b; Ahmad, 1983; Yu and Ing, 1984)。これと同様の現象がナミハダニにおいてもみられる(Mullin and Croft, 1983)。これらの現象と前述のハダニ類の生態的および遺伝的特性を併せて考えると、ハダニ類において種内変異が生じ、それらが隔離され、遺伝的分化を遂げる場合の要因の一つとして、寄生性の進化がきわめて重要な意味をもつことが推測される。すなわち、ある種の植物は生体防御機構の一つとして、二次物質を生産する能力を備え、これによって害虫による加害や病原菌の進入を防いでいる。タバコが生産するニコチンなどはこの典型的な例で、カンキツ類におけるテルペン類なども同様の役割を果たしていると考えられる。事実、PR型ミカンハダニが発育できないカンキツ類(GRP1)で発育したCT型ミカンハダニのエステラーゼ活性が上昇する現象は、GRP1の二次物質による酵素誘導を強く印象づけるものである。また、古橋・西野(1979b)および森本・高藤(1983)はウンシュウミカンとナシ、モモにおけるミカンハダニの産卵数と内的自然増加率を比較し、ミカンハダニの増殖能力はウンシュウミカンよりもナシやモモで高いことを示した。本研究ではカンキツ葉での発育率を調査した際にPR型ミカンハダニの逃亡率が高くなる傾向がみられた。これらは、カンキツの持つある種の成分がPR型ミカンハダニに対して忌避的に作用している可能性を示唆している。また、カラタチではよく発育するにも関わらずカラタチとネーブルの交雑種

やカラタチとオレンジの体細胞雑種ではほとんど発育できない点から、カンキツ属の持つ成分がPR型ミカンハダニの発育を阻害していることが予想される。これらの観点から、PR型がカンキツで発育できない理由として、二次物質の影響が重要と考えられる。また、PR型ミカンハダニは冬季に卵休眠することによってナシやモモ、クワなどの落葉性の樹種で永続的に個体群を維持することができるが、休眠しないCT型個体群はこれらの樹種では越冬できない (Takafuji and Fujimoto, 1986)。これら寄生性や休眠性の適応的変異の方向性については、今後、近縁種も含めてCT型およびPR型間の系統関係が解明されるのを待たねばならない。

PR型の北海道産 (HkSp) と岡山産 (OyOy2') 個体群間の交配では、正逆交配のいずれにおいてもF₁が得られる頻度がきわめて低く、これらの個体群間に顕著な生殖的不親和性が存在することが明らかになった。これらの内、OyOy2'はTakafuji and Fujimoto (1985) が用いた個体群と同様にナシから採集されたものであり、一方HkSpはEhara (1956) が報告したのとほぼ同じ地域のヤマグワから採集された個体群である。HkSpのエステラーゼ活性は他の地域のPR型個体群に比べて顕著に低く、またクワではよく発育するが、他のPR型個体群がよく発育するナシでは発育できない。このことは、HkSpが寄主植物および地理的要因による隔離によってPR型の他の個体群と分化しつつあることを示唆している。このこともハダニ類の分化に寄生性の変異が大きな要因となることを支持し、その後ハダニ類の遺伝的特性である高い突然変異率と速い進化速度によってその分化の程度が増すと考えられよう。

カンキツ類に寄生しているCT型ミカンハダニにおいても α -EstI対立遺伝子頻度に地理的な偏りが認められ、遺伝的分化が生じていることが明らかになった。ミカンハダニの寄主植物の中で、特に重大な経済的被害を被っているのはカンキツ類である。また、その最も大きな原因は、防除薬剤に対して次々と抵抗性を獲得する (井上, 1989) 点にある。薬剤の散布歴は地域によって異なり、それにとまってミカンハダニの薬剤抵抗性の発達程度も異なる。このため、それぞれの個体群の生息環境や地域により、様々な遺伝的変異が生じていることが予想される。ミカンハダニのエステラーゼと薬剤抵抗性との関係については、本研究の結果からは明確にできない。しかし、 α -EstI対立遺伝子頻度の地理的差異が検出されたことにより、CT型ミカンハダニの個体群間における遺伝的形質の変化の一部を証明できた。今後、薬剤抵抗性に直接関与している遺伝子と、これらの淘汰に対して中立な遺伝子の地理的変異を検出することができれば、薬剤散布による遺伝的分化の実態とそれがミカンハダニ個体群の遺伝的構造に及ぼす影響を把握できると考えられる。一方、 α -EstI対立遺伝子に関する調査ではほとんどの個体群において、遺伝子型頻度の実測値とハーディー・ワインベルグの法則から推定される

期待値との間に有意差は認められなかった。このことは、ハダニ類では近親交配が頻繁であり、そのために集団の近交係数が上昇し、集団間の遺伝的距離が拡大し易いという仮説と矛盾することを示唆している。しかし一方で、発生初期の遺伝子型頻度をみると、ホモ個体の頻度が有意に高くなり、近親交配の頻度が高いことがうかがえる。したがって、ハダニ類に特徴的な繁殖様式が遺伝子型頻度を与える影響は発生密度や空間分布パターンによって異なり、今後さらに研究する必要がある。

本研究では、ハダニ類においてアイソザイム分析を応用して生態的形質の差異とそれに伴う形態的形質の差異を明らかにした。種内における遺伝的分化が生じ易いと考えられるハダニ類では、最近になってオウトウハダニ T. viennensis Zacher の休眠性とエステラーゼアイソザイムとの関係について研究されている (Gotoh et al., 1991)。昆虫類においても駒崎 (1991) がエステラーゼアイソザイムによるユキヤナギアブラムシ Aphis citricola van der Goot のバイオタイプの識別を行い、またワタアブラムシ A. gossypii Glover の寄生性の分化についても同様の手法による判別法の確立が期待されている。さらに、クリタマバチ Dryocosmus kuriphilus Yasumatsu の寄生蜂で近年中国から日本へ導入されたチュウゴクオナガコバチ Torymus sinensis Kamijo (村上ら, 1977; 村上・清田, 1983; Otake et al., 1984) と在来種のクリマモリオナガコバチ T. beneficus Yasumatsu et Kamijo との間の交雑や競争の問題が生じている。しかし、これら 2 種の寄生蜂には雌成虫の産卵管鞘と胸部の長さの比率が異なる以外には形態的差異が認められていない (Kamijo, 1982; Otake, 1987)。このため、雄成虫では種の判別が不可能であり、交雑や競争を解析するための手法がない。本研究で用いたアイソザイム分析による変異の識別法は、ハダニ類だけでなく、昆虫類においても幅広く応用できる手法であり、今後、多方面における活用が期待される。

要 約

ミカンハダニはカンキツやナシ、モモなどを加害する重要な果樹害虫である。このミカンハダニには年間を通じて休眠しない非休眠系統と、冬季に卵態で休眠する休眠系統が存在する。近年、これら両系統の分布の様相が変化し、なおかつ複雑化している。休眠性の有無は発消長や個体群の動態に影響を及ぼすため、両系統の分布と生態的特性の差異を把握した上で防除法を検討することが重要である。しかし、これらの系統間に顕著な形態差異がないため、両者の識別は困難で、このことが種々の調査を行う上で大きな障害になってきた。ミカンハダニの個体群間には寄生性の変異も存在するが、休眠性と寄生性との関係については十分に解明されていない。そこで、本研究では遺伝学的手法を用いてミカンハダニの非休眠系統と休眠系統の識別法を確立し、休眠性と寄生性との関係を解明した。また、これらの結果と遺伝学的手法をもとに分類された個体群の形態に関する調査ならびに本研究の間に他の研究者により蓄積された新しい知見を総括して分類学上の基準に照らし、主に生物学的観点からこれら2系統の分類学的位置づけを行った。最後に、集団の遺伝的構造と生殖的隔離の両面から解析し、ミカンハダニにおける変異個体群の分化の要因について考察した。

生態的特性の変異とエステラーゼアイソザイム

1. アガロースゲル電気泳動法により、6本のエステラーゼ泳動帯 ($E_1 \sim E_6$) を検出した。この中で、 E_3 泳動帯はミカンハダニがカンキツに寄生した場合に活性が高まり、ナシでは活性が低下することが明らかになった。また、休眠系統の存在が確認されている鳥取県と岡山県のナシから採集された個体群は $E_4 \sim E_6$ 泳動帯を有し (IV型)、 $E_3 \sim E_5$ 泳動帯が共通に検出された他の個体群の分離パターン (I~III型) と異なっていた。これにより、ミカンハダニのエステラーゼアイソザイムをその分離パターンからCT型 (I~III型) とPR型 (IV型) に分類した。

2. 電気泳動において酢酸 α -および β -ナフチルのいずれを基質に用いた場合にも、分離検出される泳動帯の相対的位置にはまったく差異がみられないこと、およびdichlorvosによる阻害様式についても各個体群において基質間の差異がほとんどなく、 k_1 も近似した数値が得られたことから、両基質を分解するCT型およびPR型個体群のエステラーゼはほぼ同一の酵素群であると考えられた。

3. ミカンハダニの寄生性の変異はカンキツでの発育率において顕著に表れる。調査した18地域のすべての個体群においてカンキツでの発育の良否とエステラーゼ型の変異は完全に一致し、カンキツ寄生型 (カンキツでの発育率80%以上) 個

体群のエステラーゼ型はCT型，ナシ寄生型（発育率10%以下）の個体群はPR型であった。また，両型が混在した2個体群をエステラーゼ型によってそれぞれ2つのサブグループに分けた結果，いずれもCT型のサブグループのカンキツでの発育率は90%以上と高く，PR型は10%以下であった。このことから，エステラーゼ型の変異は寄生型が異なる個体が混在する場合でも遺伝的に安定していることが明らかになった。また，調査に用いた18個体群の内，北海道のヤマグワから採集されたナシ寄生型個体群（HkSp）ではアガロースゲル電気泳動法によりエステラーゼ泳動帯が検出されなかった。*In vitro*での活性の調査の結果，この個体群のエステラーゼ活性は他のナシ寄生型個体群やカンキツ寄生型個体群に比べて顕著に低かった。

4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるミカンハダニのエステラーゼアイソザイムの検出を行った結果，アガロースゲル電気泳動法に対応してCT型とPR型の明瞭な判別が可能であり，かつ検出感度がより高かった。また，この手法により前述のHkSp個体群のエステラーゼアイソザイムが検出でき，PR型であることが明らかになった。

5. 14地域の個体群について，20℃短日（11L-13D）条件下での卵休眠の有無とエステラーゼ型を調査した。その結果，非休眠系統のエステラーゼ型はすべてCT型であり，休眠系統ではすべてPR型であった。したがって，休眠性の変異も寄生型と同様にエステラーゼ型の変異と一致した遺伝的に安定な特性であった。

以上の結果から，ミカンハダニの休眠性および寄生性の変異はエステラーゼ型を指標として，

CT型＝カンキツ寄生型＝非休眠型およびPR型＝ナシ寄生型＝休眠型
と定義できた。

5. 走査型電子顕微鏡および生物顕微鏡での調査により，CT型とPR型個体群間の形態的差異を検出した。雄成虫の吐糸線はCT型個体群に比べてPR型個体群の方が大きく，またPR型個体群の雌成虫の周気管末端はCT型個体群と同胞種のリンゴハダニの中間的な形状を呈した。爪間体の形状は両型間で顕著に異なり，爪間体と腹毛との角度はCT型ではほぼ直角であるのに対して，PR型ではこの角度が90度より小さかった。また，爪間体の曲率はPR型に比べてCT型の方が明らかに小さく，鋭く曲がっていた。形態的差異は雌成虫の背毛長（C4，L4，CLおよびP1）ならびにそれらの比率によっても検出され，これらの比率を用いたクラスター分析では両型の個体群は異なったクラスターを形成した。

これらの結果と近年蓄積された他の知見を総括することにより，ミカンハダニのCT型およびPR型個体群は生物学的には別種として取り扱うのが妥当と考えられた。

変異集団の分化の要因

1. CT型個体群のエステラーゼアイソザイムは一部で顕著な多型性を示し、これらは2対立遺伝子 (A, B) を持つ単一の遺伝子座 (α -Est1) に由来することが判明した。

2. α -Est1対立遺伝子の地理的分布を調査した結果、A対立遺伝子の出現頻度は九州地方で顕著に高く、地理的に偏りがみられた。九州地方のカンキツ園および発生密度の高いナシ園から採集された各個体群の遺伝子型頻度はハーディー・ワインベルグの法則から推定される期待値とほぼ一致した。一方、発生初期のナシ園から採集された個体群の遺伝子型頻度はハーディー・ワインベルグの法則による期待値に比べてホモ個体の頻度が高かったことから、発生のごく初期でパッチ状に個体が存在するような段階では、由来の異なる個体と出会う機会が少なく、その結果近親交配の頻度が高まることがうかがえた。

3. 北海道のヤマグワから採集されたPR型個体群の寄主範囲がこれまでに報告されている休眠系統 (PR型) と異なり、クワでは発育するが他のPR型個体群が発育するナシやインゲンマメでは発育できず (クワ寄生型)、またこの個体群と他のPR型個体群との間に不完全ながら生殖的不和合性がみられた。

4. CT型およびPR型個体群の発育率により、植物を3つのグループ (GRP1, CT型だけが発育できるもの; GRP2, CT型とPR型が共によく発育するもの; GRP3, 両エステラーゼ型が共に発育できないもの) に分類した。この結果、GRP1にはカラタチを除いたカンキツ類が含まれ、GRP2にはナシ、モモおよびカラタチが含まれた。PR型個体群はカラタチではよく発育するが、トロビタオレンジとカラタチの体細胞雑種では発育できなかった。PR型が発育できないGRP1で発育したCT型個体のエステラーゼ活性は、GRP2で発育した個体に比べて顕著に高かった。これらの結果から、寄生性の変異に植物の二次物質による発育阻害作用が関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、ミカンハダニの遺伝的分化の要因として、地理的および寄主植物間における隔離と発生初期における近親交配の機会的増加ならびに寄主植物との相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。

引用文献

- Ahmad, S. (1983) Mixed-function oxidase activity in a generalist herbivore in relation to its biology, food plants, and feeding history. *Ecology* 64: 235-243
- Aldridge, W. N. (1950) Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. *Biochem. J.* 46: 451-456.
- Aotsuka, T. and T. Asami (1979) A simplified apparatus for vertical slab gel electrophoresis. *Japan J. Genetics* 54: 397-400.
- Ashihara, W. (1987) Infestation and reproduction of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae) on leguminous plants. *Appl. Ent. Zool.* 22: 512-518.
- Berry, R. E., S. J. Yu and L. C. Terriere (1980) Influence of host plants on insecticide metabolism and management of variegated cutworm. *J. Econ. Entomol.* 73: 771-774.
- Blank, R. H. (1979) Studies on the non-specific esterase and acetylcholinesterase isozymes electrophoretically separated from the mites Sancassania berlesei (Tyroglyphidae) and Tetranychus urticae (Tetranychidae). *N. Z. J. Agric. Res.* 22: 497-506.
- Boudreaux, H. B. (1963) Biological aspects of some phytophagous mites. *Ann. Rev. Entomol.* 8: 137-154.
- Brader, L. (1977) Resistance in mites and insects affecting orchard crops. *Pesticide management and insecticide resistance* (edited by D. L. Watson and A. W. A. Brown), Academic press, New York, pp.353-376.
- Brattsten, L. B., C. F. Wilkinson and T. Eisner (1977) Herbivore-plant interactions: Mixed-function oxidases and secondary plant substances. *Science* 196: 1349-1352.
- Crozier, R. H. (1985) Adaptive consequences of male-haploidy. Spider mites. Their biology, natural enemies and control 1A (edited by W. Helle and M. W. Sabelis), Elsevier, Amsterdam, pp.201-222.
- de Boer, R. (1981) Genetic affinities between spider mite Tetranychus urticae populations in a non-agricultural area II. *Ent. exp. & appl.* 30: 63-67.

- de Boer, R. (1985) Reproductive barriers. Spider mites. Their biology, natural enemies and control 1A (edited by W. Helle and M. W. Sabelis), Elsevier, Amsterdam, pp.193-199.
- Devonshire, A. L. (1977) The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, Myzus persicae (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. Biochem. J. 167: 675-683.
- Devonshire, A. L. and R. M. Sawicki (1979) Insecticide resistant Myzus persicae as an example of evolution by gene duplication. Nature 280: 140-141.
- Ehara, S. (1955) On two spider mites parasitic on Japanese citrus. Annot. Zool. Japan. 28: 178-182.
- Ehara, S. (1956) Tetranychoid mites of mulberry in Japan. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool. 12: 499-510.
- 江原昭三 (1975a) 総論. 農業ダニ学 (江原昭三・真梶徳純 編), 東京: 全国農村教育協会, pp.5-24.
- 江原昭三 (1975b) 形態. 農業ダニ学 (江原昭三・真梶徳純 編), 東京: 全国農村教育協会, pp.25-54.
- 江原昭三 (1975c) 分類. 農業ダニ学 (江原昭三・真梶徳純 編), 東京: 全国農村教育協会, pp.55-132.
- Ehara, S. and T. Gotoh (1991) A new species of Panonychus from dwarf bamboo in Japan (Acarina: Tetranychidae). Internat. J. Acarol. 17: 9-12.
- Ehara, S. and Y. P. Tho (1988) Spider mites of the Malay Peninsula (Acarina: Tetranychidae). J. Fac. Educ. Tottori Univ. Nat. Sci. 37: 1-24.
- Fujimoto, H. and A. Takafuji (1986) Photoperiodic sensitivity of various stages of the diapausing strain of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). Appl. Ent. Zool. 21: 582-588.
- Fujimoto, H. and A. Takafuji (1988) Critical daylength for diapause induction and properties of non-ovipositing females in the diapausing strain of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). Appl. Ent. Zool. 23: 161-166.
- 古橋嘉一 (1980) ミカンハダニの個体群動態に関する研究. 静岡柑試特報 4: 1-56.
- 古橋嘉一・西野 操 (1979a) ミカンハダニの増殖に及ぼす降雨の影響. 静岡柑試

- 研報15: 29-36.
- 古橋嘉一・西野 操 (1979b) ミカンハダニのミカン葉と他の果樹の葉における産卵数の差異. 静岡柑試研報15: 41-44.
- Goka, K. and A. Takafuji (1990) Genetical studies on the diapause of the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (1). Appl. Ent. Zool. 25: 119-125.
- Goka, K. and A. Takafuji (1991) Genetical studies on the diapause of the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (2). Appl. Ent. Zool. 26: 77-84.
- Gotoh, T., Y. Ishikawa, K. Takayama and M. Suzuki (1991) Differences in esterase zymograms between non-diapausing and diapausing individuals of the hawthorn spider mite, Tetranychus viennensis Zacher (Acari: Tetranychidae). Appl. Ent. Zool. 26: 153-155.
- 後藤哲雄・真梶徳純 (1981) 日本産ナミハダニ Tetranychus urticae Koch の休眠誘起の臨界日長とその地理的変異. 応動昆25: 113-118.
- Gutierrez, J. and W. Helle (1985) Evolutionary changes in the Tetranychidae. Spider mites. Their biology, natural enemies and control 1A (edited by W. Helle and M. W. Sabelis), Elsevier, Amsterdam, pp. 91-107.
- Hama, H. and A. Hosoda (1988) Individual variation of aliesterase activity in field populations of Aphis gossypii Glover (Homoptera: Aphididae). Appl. Ent. Zool. 23: 109-112.
- 浜村徹三 (1984) チャとクサギから採集したカンザワハダニ2系統の殺ダニ剤に対する感受性. 茶技研66: 26-32.
- 浜村徹三 (1985) チャに寄生するカンザワハダニの水酸化トリシクロヘキシルスズ剤 (プリクトラン) に対する抵抗性発達の地域差. 茶研報62: 46-51.
- 浜村徹三・芦原 亘・井上晃一・真梶徳純 (1984) 新植ウンシュウミカン園の薬剤散布・無散布区における害虫及び天敵相と樹の生育. 果樹試報E5: 77-106.
- Hartl, D. L. (1972) A fundamental theorem of natural selection for sex linkage or arrhenotoky. Am. Nat. 106: 516-524.
- 八田茂嘉 (1973) 和歌山県におけるミカンハダニの薬剤抵抗性. 果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する研究 (岩田俊一・野村健一・奥代重敬・菅原寛夫・田中学・津谷武樹 編), 日本植物防疫協会, 東京, pp.68-73.
- Helle, W. (1967) Fertilization in the two-spotted spider mite (Tetranychus urticae: Acari). Ent. exp. & appl. 10: 103-110.

- Helle, W. (1968) Genetic variability of photoperiodic response in an arrhenotokous mite (Tetranychus urticae). Ent. exp. & appl. 11: 101-113.
- Helle, W. (1984) Aspects of pesticide resistance in mites. Acarology VI, vol. 1 (edited by D. A. Griffiths and C. E. Bowman), Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp.122-131.
- Helle, W. (1985) Genetics. Spider mites. Their biology, natural enemies and control 1A (edited by W. Helle and M. W. Sabelis), Elsevier, Amsterdam, pp.185-192.
- Helle, W. and W. P. J. Overmeer (1973) Variability in tetranychid mites. Annu. Rev. Entomol. 18: 97-120.
- Helle, W. and L. P. Pijnacker (1985) Parthenogenesis, chromosomes and sex. Spider mites. Their biology, natural enemies and control 1A (edited by W. Helle and M. W. Sabelis), Elsevier, Amsterdam, pp.129-140.
- Helle, W. and A. Q. van Zon (1967) Rates of spontaneous mutation in certain genes of an arrhenotokous mites, Tetranychus pacificus McGregor. Entomol. exp. Appl. 10: 189-193.
- 平嶋義宏・森本 桂・多田内修 (1989) 昆虫分類学. 東京: 川島書店, 597p.
- Ignatowicz, S. (1985) Genetic basis of diapause in the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (Acarina: Tetranychidae). Treatises and monographs. Warsaw agricultural university press, Warszawa, 61p..
- 井上晃一 (1972) ミカンハダニの異系統間交雑F₁雌成虫の不妊性とその卵の致死率ならびに可視突然変異型の出現. 園試報D7: 29-38.
- 井上晃一 (1986) ミカンハダニの薬剤抵抗性の遺伝的特性に関する研究. 果樹試報E6: 117-180.
- 井上晃一 (1989) ハダニ類の薬剤抵抗性の機構. 遺伝的特性を中心に. 植物防疫 43: 367-371.
- 井上雅央 (1987) ワタアブラムシのエステラーゼ活性と有機リン剤感受性. 応動昆 31: 404-406.
- Kamijo, K. (1982) Two new species of Torymus (Hymenoptera, Torymidae) reared from Dryocosmus kuriphilus (Hymenoptera, Cynipidae) in China and Korea. Kontyu 50: 505-510.
- 加藤 勉 (1972) ミカンハダニの葉における季節的行動. 応動昆 16: 154-156.

- 木村義典・貞井慶三（1973）広島県におけるミカンハダニの薬剤抵抗性。果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する研究（岩田俊一・野村健一・奥代重敬・菅原寛夫・田中 学・津谷武樹 編），日本植物防疫協会，東京，pp.74-76.
- 駒崎進吉（1991）ユキヤナギアブラムシの生活史。特にそのバイオタイプに関する研究。果樹試報・特報2：1-60.
- 国本佳範・真梶徳純・天野 洋（1991）ミカンハダニ系統間およびリンゴハダニとの種間の生殖的隔離に関する研究。応動昆35：103-108.
- 桑原雅彦（1982）カンザワハダニのアセチルコリンエステラーゼと非特異的エステラーゼの性質。応動昆26：288-293.
- 桑原雅彦（1984a）ハダニ類の薬剤抵抗性。植物防疫38：321-327.
- 桑原雅彦（1984b）カンザワハダニの薬剤抵抗性に関する研究。農技研報C39：1-75.
- Kuwahara, M. (1984) Resistance of the Kanzawa spider mite to acaricides with special reference to organophosphorus and carbamate compounds. JARQ 18: 99-104.
- Kuwahara, M., T. Miyata, T. Saito and M. Eto (1981) Relationship between high esterase activity and in vitro degradation of ^{14}C -malathion by organophosphate-resistant and susceptible strains of the Kanzawa spider mite, Tetranychus kanzawai Kishida (Acarina: Tetranychidae), and their inhibition with specific synergists. Appl. Ent. Zool. 16: 297-305.
- Kuwahara, M., T. Miyata, T. Saito and M. Eto (1982) Activity and substrate specificity of the esterase associated with organophosphorus insecticide resistance in the Kanzawa spider mite, Tetranychus kanzawai Kishida (Acarina: Tetranychidae). Appl. Ent. Zool. 17: 82-91.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680.
- 松本 要・藤原多見夫・藤原昭雄（1983）シミュレーションによるミカンハダニ発生予察法の一試案。広島果樹試研報9：29-43.
- 松尾嘉行・関 道生（1969a）ミカンハダニによる被害の解析的研究（第2報）加害時期および加害量が温州ミカン幼樹の生育におよぼす影響。佐賀果試研報5：55-58.
- 松尾嘉行・関 道生（1969b）ミカンハダニによる被害の解析的研究（第3報）ミカンハダニの加害が温州みかん果実の品質におよぼす影響。佐賀果試研報5：59-64.

- 松尾嘉行・関 道生 (1976) ミカンハダニによる被害の解析的研究 (第4報) ミカンハダニの加害がウンシュウミカン果実の収量におよぼす影響. 佐賀果試研報 6: 67-73.
- McGregor, E. A. and E. J. Newcomer (1928) Taxonomic status of the deciduous-fruit Paratetranychus with reference to the citrus mite (P. citri). J. Agric. Res. 36: 157-181.
- Miyata, T., H. Honda, T. Saito, K. Ozaki and Y. Sasaki (1976) In vitro degradation of ^{14}C -methyl malathion by organophosphate susceptible and resistant smaller brown planthopper, Laodelphax striatellus Fallen. Botyu-Kagaku 41: 10-15.
- Miyata, T. and T. Saito (1976) Mechanism of malathion resistance in the green rice leafhopper, Nephotettix cincticeps Uhler (Hemiptera: Deltocephalidae). J. Pesticide Sci. 1: 23-29.
- 宮田 正・斎藤哲夫・深町三朗・桐谷圭治・川原幸夫・吉岡幸治郎・尾崎幸三郎・佐々木善隆・坪井昭正・浜 弘司・岩田俊一 (1981) ツマグロヨコバイにおける殺虫剤抵抗性とアリエステラーゼとの関連について. 応動昆 25: 150-155.
- Miyata, T., T. Saito and K. Yasutomi (1984) High malathion degradation in malathion resistant Culex pipiens quinquefasciatus. Jap. J. Sanit. Zool. 35: 245-249.
- 森 介計 (1964) ミカンハダニの発生と天敵類の活動およびこれらの薬剤散布との関係. 愛媛県果試研報 4: 43-55.
- 森 介計・武智文彦 (1973) 愛媛県におけるミカンハダニの薬剤抵抗性. 果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する研究 (岩田俊一・野村健一・奥代重敬・菅原寛夫・田中 学・津谷武樹 編), 日本植物防疫協会, 東京, pp.77-81.
- 森本信生・高藤晃雄 (1983) 岡山県南部に発生するミカンハダニ個体群の休眠性と寄主選択性の比較. 応動昆 27: 224-228.
- 本山直樹 (1981) 殺虫剤抵抗性の生化学. 昆虫学最近の進歩 (石井象二郎編), 東京大学出版会: 東京, pp.553-569.
- Mullin, C. A. and B. A. Croft (1983) Host-related alterations of detoxification enzymes in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). Environ. Entomol. 12: 1278-1282.
- 村上陽三・清田洋次 (1983) クリタマバチ輸入天敵チュウゴクオナガコバチの放飼実験. (1) 熊本県における放飼実験. 九病虫研会報 29: 197-203.
- 村上陽三・梅谷献二・於保信彦 (1977) クリタマバチ寄生蜂の中国大陸からの予備的導入と放飼試験. 応動昆 21: 197-203.

- 村岡 実 (1983) ミカンハダニの密度に対する降雨の影響. 佐賀果試研報 8 : 91-102.
- Nakao, S., K. Nohara and A. Nagatomi (1977) Studies on pests and their predators at two groves of "Kuroshima-mikan", a native citrus on Nagashima, Kagoshima Pref. Appl. Ent. Zool. 12: 334-346.
- 根井正利 (1979) 遺伝距離と分子分類学. 遺伝33: 53-61.
- Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics, Columbia univ. press, New York. 512p.
- 西野敏勝・大串龍一 (1973) 長崎県におけるミカンハダニの薬剤抵抗性. 果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する研究 (岩田俊一・野村健一・奥代重敬・菅原寛夫・田中 学・津谷武樹 編), 日本植物防疫協会, 東京, pp.89-93.
- Ogita, Z. and T. Kasai (1965) A microtechnique for enzyme separation of individual spider mites with thin layer electrophoresis. SABCO Journal 1: 117-120.
- Ohgawara, T. and S. Kobayashi (1991) Application of protoplast fusion to Citrus breeding. Food Biotechnology 5: 169-184.
- Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara, H. Uchimiya and S. Ishii (1985) Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between Citrus sinensis and Poncirus trifoliata. Theor Appl Genet 71: 1-4.
- 大久保宣雄 (1983) ミカンハダニの加害がミカン樹の生長に及ぼす影響. 九病虫研会報29: 142-147.
- Ohnishi, S., M. Kawanishi and T. K. Watanabe (1983) Biochemical phylogenies of Drosophila: protein differences detected by two-dimensional electrophoresis. Genetica 61: 55-63.
- Oliver, H. L., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biological Chemi. 193: 265-275.
- Oppenoorth, F. J. and K. van Asperen (1960) Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. Science 132: 298-299.
- Osakabe, Mh. (1987a) Esterase activities and developmental success of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae), on several plants. Appl. Ent. Zool. 22: 35-44.
- Osakabe, Mh. (1987b) Difference of esterase isozymes between non-diapausing and diapausing strains of the citrus red mite, Panonychus

- citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). Appl. Ent. Zool. 22: 577-584.
- 刑部正博 (1991) ハダニ類の変異機構. 分子レベルからのアプローチ. 化学と生物29: 304-311.
- Osakabe, Mh. and K. Inoue (1988) Selection with fenbutatin oxide of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae), and susceptibility of selected populations to cyhexatin. Bull. Fruit Tree Res. Stn. E7: 71-80.
- Osakabe, Mh., S. Kobayashi and W. Ashihara (1990) Development of the European red mite, Panonychus ulmi (Koch) (Acari: Tetranychidae), on mulberry and some other plants. Appl. Ent. Zool. 25: 326-328.
- 刑部 勝 (1967) カンザワハダニの生態学的研究. 茶試研報4: 35-156.
- 刑部 勝 (1973a) カンザワハダニの薬剤抵抗性に関する研究. 茶試研報8: 1-95.
- 刑部 勝 (1973b) チャ寄生カンザワハダニの薬剤抵抗性. 果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する研究 (岩田俊一・野村健一・奥代重敬・菅原寛夫・田中 学・津谷武樹 編), 日本植物防疫協会, 東京, pp.102-103.
- Otake, A. (1987) Comparison of some morphological characters among two strains of Torymus beneficus Yasumatsu et Kamijo and T. sinensis Kamijo (Hymenoptera: Torymidae). Appl. Ent. Zool. 22: 600-609.
- Otake, A., S. Moriya and M. Shiga (1984) Colonization of Torymus sinensis Kamijo (Hymenoptera: Torymidae), a parasitoid of the chestnut gall wasp, Dryocosmus kuriphilus Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), introduced from China. Appl. Ent. Zool. 19: 111-114.
- Pamilo, P., A. Pekkari and S. -L. Varvio-Aho (1981) Phylogenetic relationships and the origin of social parasitism in Vespidae and in Bombus and Psithyrus as revealed by enzyme genes. Biosystematics of social insects. Systematics Association Special Volume No. 19 (edited by P. E. Howse and J. -L. Clement), Academic Press, London and New York, pp.37-48.
- Pamilo, P., A. Pekkari and S. -L. Varvio (1987) Clustering of bumblebee subgenera based on interspecific genetic relationships (Hymenoptera, Apidae: Bombus and Psithyrus). Ann. Zool. Fennici 24: 19-27.
- Pamilo, P., S. -L. Varvio-Aho and A. Pekkari (1984) Genetic variation in bumblebees (Bombus, Psithyrus) and putative sibling species of

- Bombus lucorum. Hereditas 101: 245-251.
- Pekkarinen, A. (1979) Morphometric, colour and enzyme variation in bumblebees (Hymenoptera, Apidae, Bombus) in Fennoscandia and Denmark. Acta Zoologica Fennica 158: 1-60.
- Pritchard, A. E. and E. W. Baker (1955) A revision of the spider mite family Tetranychidae. San Francisco: The Pacific Coast Entomological Society.
- 西東 力 (1989) ワタアブラムシ Aphis gossypii Glover の薬剤抵抗性. I. 静岡県における薬剤感受性低下の実態とエステラーゼ活性. 応動昆33: 204-210.
- 関 道生・小林和幸 (1963) ミカンハダニによる被害の解析的研究 (第1報) 温州ミカン幼木における生育阻害. 九州農業研究25: 239.
- 関 道生・松尾嘉行 (1973) 佐賀県におけるミカンハダニの薬剤抵抗性. 果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する研究 (岩田俊一・野村健一・奥代重敬・菅原寛夫・田中 学・津谷武樹 編), 日本植物防疫協会, 東京, pp.82-88.
- 真梶徳純 (1959a) ミカンハダニの発育に及ぼす温湿度の影響. II 孵化以後の発育形態に及ぼす温湿度の影響. 東近農試研報5: 129-142.
- 真梶徳純 (1959b) ミカンハダニの季節的発生消長に関する研究. I 柑橘苗木におけるミカンハダニの消長について. 東近農試研報5: 143-166.
- 真梶徳純 (1961a) 主要果樹に寄生するミカンハダニの地理的分布. 東近農試研報6: 49-63.
- 真梶徳純 (1961b) ミカンハダニの休眠性について. 東近農試研報6: 64-76.
- 真梶徳純 (1962) ミカンハダニの季節的発生消長に関する研究. II Peak時の生息数と環境因子との相関関係. 園試報B1: 182-191.
- 真梶徳純 (1975) 生態. 農業ダニ学 (江原昭三・真梶徳純 編), 東京: 全国農村教育協会, pp.133-186.
- 真梶徳純・三田 毅・天野 洋・福田 寛・藤家 梓 (1986) 千葉県のカシにおけるミカンハダニの休眠系統と非休眠系統の地理的分布. 関東東山病害虫研会報33: 219-220.
- 真梶徳純・内田正人 (1980) 鳥取産休眠性ミカンハダニの光周反応. 千葉大園学報27: 51-54.
- 塩見正衛・古橋嘉一・荻原洋晶・村岡 実 (1983) システム・シミュレーションによるミカンハダニの発生予察. 植物防疫37: 448-453.
- Smissaert, H. R. (1965) Esterases in spider mites hydrolysing α -naphthylacetate. Nature 205: 158-160.
- Smissaert, H. R., S. Voerman, L. Oostenbrugge and N. Renooy (1970)

- Acetylcholinesterases of organophosphate-susceptible and -resistant spider mites. J. Agr. FOOD CHEM. 18: 66-75.
- Sula, J. and F. Weyda (1983) Esterase polymorphism in several populations of the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch. Experientia 39: 78-79.
- 孫 緒良・真梶徳純・天野 洋 (1988) 千葉県北部のナシにおける休眠性と非休眠性ミカンハダニの発生経過. 応動昆32: 260-265.
- Takada, H. and Y. Murakami (1988) Esterase variation and insecticide in Japanese Aphis gossypii. Entomol. exp. appl. 48: 37-41.
- Takafuji, A. (1986) Effectiveness of second mating for two incompatible types of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor). Res. Popul. Ecol. 28: 91-101
- 高藤晃雄 (1986) ミカンハダニの系統間の生殖隔離. 植物防疫40: 433-438.
- Takafuji, A. (1988) Mating between diapausing and nondiapausing strains of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor). Mem. ent. Soc. Can. 146: 181-189
- 高藤晃雄・芦原 亘・森本信生 (1981) ハダニ類の休眠に関する研究の現状と問題点. 植物防疫35: 489-495.
- Takafuji, A. and H. Fujimoto (1985) Reproductive compatibility between populations of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). Res. Popul. Ecol. 27: 361-372.
- Takafuji, A. and H. Fujimoto (1986) Winter survival of the non-diapausing population of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) (Acarina: Tetranychidae) on pear and citrus. Appl. Ent. Zool. 21: 467-473.
- 高藤晃雄・井上雅央・小田道宏 (1989) 奈良県に発生するナミハダニ個体群の休眠性. 応動昆33: 134-139.
- Takafuji, A. and N. Morimoto (1983) Diapause attributes and seasonal occurrences of two populations of the citrus red mite, Panonychus citri (McGregor) on pear (Acarina: Tetranychidae). Appl. Ent. Zool. 18: 525-532.
- Takai, K. (1986) Discrimination among strains of the mosquito Anopheles leucosphyrus group by electrophoresis of proteins. Jpn. J. Genet. 61: 45-59.
- 武久 喬・田中 学 (1967) 寒天薄層電気泳動法によるミカンハダニ薬剤抵抗性

- の検定について. 九病虫研会報13: 126-132.
- 田中 学・井上晃一 (1964) ミカンハダニの被害解析 (予報). 九州農業研究26: 143-144.
- 田中 学・井上晃一 (1970) カンキツ園における天敵利用に関する基礎的研究.
II ミカンハダニの発生予察法について. 園試報D6: 1-40.
- 田中 学・井上晃一・喜多奎理 (1972) ミカンハダニの薬剤抵抗性に関する研究.
IX E₁エステラーゼ活性泳動帯によるハダニのCMP剤 (Phenkapton) 抵抗性の検
定法に関する遺伝的実証. 園試報D7: 39-44.
- 建石繁明 (1987) ハダニ類の寄生がセイヨウナシの葉やけ発生に及ぼす影響. 信
州大学農学部紀要24: 1-79.
- 藤條純夫 (1980) 核酸, 蛋白質, 尿酸の分画分析法. 昆虫実験法 研究編 (一瀬
太良・石原 廉・松本義明・大羽 滋・岡田益吉・斎藤哲夫・吉武成美 編),
東京: 学会出版センター, pp.13-28.
- 内田正人 (1982) ナシ園におけるハダニ類の発生と被害に関する研究, 特に休眠
性の生態的特性. 鳥取果試特報2: 1-63.
- 内田正人・真梶徳純 (1980) ナシを加害する鳥取産休眠性ミカンハダニ越冬卵の
産卵時期とふ化時期. 応動昆24: 18-23.
- 内田正人・牛山欽司・大垣智昭 (1966) 温州ミカンの主要病害虫の発生予察法に
関する研究 (第2報) 2. ミカンハダニの発生量が温州ミカンの生育, 品質に
およぼす影響について. 神奈川園試研報14: 17-24.
- van Asperen, K. (1962) A study of housefly esterases by means of a
sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol. 8: 401-416.
- Veerman, A. (1985) Diapause. Spider mites. Their biology, natural
enemies and control 1A (edited by W. Helle and M. W. Sabelis),
Elsevier, Amsterdam, pp. 279-316.
- Wanibuchi, K. and Y. Saito (1983) The process of population increase and
patterns of resource utilization of two spider mites, Oligonychus
ununguis (Jacobi) and Panonychus citri (McGregor), under experimental
conditions (Acari: Tetranychidae). Res. Popul. Ecol. 25: 116-129.
- Ward, P. S. (1980) Genetic variation and population differentiation in
the Rhytidoponera impressa group, a species complex of ponerine ants
(Hymenoptera: Formicidae). Evolution 34: 1060-1076.
- Ward, P. S., I. A. Boussy and D. E. Swincer (1982) Electrophoretic
detection of enzyme polymorphism and differentiation in three species
of spider mites (Tetranychus) (Acari: Tetranychidae). Ann. Entomol.

Soc. Am. 75: 595-598.

Watada, M., Y. N. Tobar and S. Ohba (1986) Genetic differentiation in Japanese populations of Drosophila simulans and D. melanogaster. I. Allozyme polymorphisms. Jpn. J. Genet. 61: 253-269.

Watanabe, T. K. and M. Kawanishi (1979) Mating preference and the direction of evolution in Drosophila. Science 205: 906-907.

Weyda, F., J. Sula and M. Gesner (1984) Toxicological, morphological and biochemical characteristics of field populations of the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae (Acarina: Tetranychidae). Sbor. UVTIZ -Ochr. Rostl. 20: 123-129.

矢後正俊・古郡信次 (1937a) ナシハダニに関する研究. 病虫害雑誌24: 593-605, 675-687.

矢後正俊・古郡信次 (1937b) ナシハダニの学名ならびに和名. 病虫害雑誌24: 842.

山田健一・野田政春 (1985) 福岡県におけるナシの休眠性ミカンハダニの初発生と発生生態について. 福岡農総試研報B5: 35-38.

横山桐郎・石井五郎 (1934) 桑を害する葉蟬の研究(2). 「くわおほはだに」 Panonychus mori Kishidaの形態並に生態. 蚕試報告8: 425-454.

Yu, S. J. (1982a) Induction of microsomal oxidases by host plants in the fall armyworm, Spodoptera frugiperda (J. E. Smith). Pestic. Biochem. Physiol. 17: 59-67.

Yu, S. J. (1982b) Host plant induction of glutathione S-transferase in the fall armyworm. Pestic. Biochem. Physiol. 18: 101-106.

Yu, S. J. and R. T. Ing (1984) Microsomal biphenyl hydroxylase of fall armyworm larvae and its induction by allelochemicals and host